

RESPOSTA HUMORAL CONTRA LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDADE EM DOENTES COM PSORÍASE

MARIA JOÃO FIGUEIROA DE GOIS PAIVA LOPES

Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina

na Especialidade de Medicina Clínica (Dermatovenereologia)

na NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas

Julho, 2017

RESPOSTA HUMORAL CONTRA LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDADE EM DOENTES COM PSORÍASE

Maria João Figueiroa de Gois Paiva Lopes
Orientador: Professor Doutor José Delgado Alves,
Professor Associado NMS/FCM

Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina
na Especialidade de Medicina Clínica (Dermatovenereologia)

Julho, 2017

E quanto mais subimos no que desejaríamos saber,
mais descemos no que sabemos

Fernando Pessoa (1888 – 1935)

in O livro do desassossego

Índice Geral

Índice de Figuras	8
Índice de Tabelas	9
Agradecimentos	13
Abreviaturas	15
Preâmbulo	21
Resumo	23
Abstract	27
Introdução.....	30
Psoríase.....	30
Epidemiologia.....	31
Genética.....	32
Fisiopatologia.....	33
Queratinócitos.....	35
Células dendríticas	36
Linfócitos	36
Macrófagos, neutrófilos, mastócitos	38
Psoríase e comorbilidades.....	39
Psoríase e doença cardiovascular.....	39
Hipertensão arterial.....	42
Diabetes	42
Obesidade	43
Dislipidémia.....	44
Aterosclerose	45
Lipoproteínas de alta densidade.....	48
Actividade anti-inflamatória.....	54
Actividade anti-oxidante.....	54

Outras funções ateroprotectoras das HDL.....	55
ApoA e ApoE	56
Lipoproteínas de alta densidade disfuncionais	57
Psoríase e lipoproteínas de alta densidade.....	60
Auto-anticorpos e aterosclerose	63
Objectivos da tese.....	66
Objectivos específicos.....	66
Métodos	67
População	67
Métodos bioquímicos.....	68
Actividade de paraoxonase 1 (PON1).....	68
Doseamento de metabolitos do óxido nítrico.....	68
Métodos imunológicos	69
Enzyme-linked Immunoabsorbant Assays (ELISA).....	69
Anticorpos IgG e IgM anti-HDL (aHDL).....	69
Anticorpos IgG anti ApoA-I (aApoA-I) e anti ApoE (aApoE).....	70
Anticorpos IgG anti paraoxonase (aPON1).....	71
Doseamento de moléculas de adesão celular (VCAM-1), interleucina -6 (IL-6) e factor de necrose tumoral α (TNF- α).....	72
Ensaaios por imunoturbidimetria	72
Quantificação de ApoA-I e ApoE	72
Cromatografia de imunoafinidade	72
Isolamento de IgG aHDL	72
Estudo funcional.....	74
Efeito dos aHDL em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs)	74
Análise estatística.....	75
Resultados	77
Análise Clínica e epidemiológica	77

Discussão.....	80
Avaliação laboratorial da coorte: marcadores de inflamação e oxidação e determinação de anticorpos anti-lipoproteínas/apoproteínas.....	82
Análise de regressão linear.....	86
Discussão.....	93
Actividade biológica dos anticorpos aHDL: estudos funcionais <i>in vitro</i>.....	95
Discussão.....	97
Discussão final	98
Considerações finais	102
Divulgação de resultados.....	103
Projectos de trabalhos futuros.....	104
Referências	106

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática da fisiopatologia da psoríase	34
Figura 2 – Representação de partícula esférica de HDL	49
Figura 3 - Comparação esquemática da nomenclatura de subclasses de HDL contendo Apo A-I separadas por diferentes processos.	50
Figura 4 – Metabolismo das HDL e transporte reverso de colesterol	52
Figura 5 – Actividade inflamatória de IgG anti-apoproteína A-I mediada por ligação ao complexo TLR2/CD14	64
Figura 6 - Títulos de anticorpos IgG anti-HDL em controlos e em doentes com psoríase	84
Figura 7 - Títulos de anticorpos IgG anti-apoproteína A-I e anti-apoproteína E em controlos e em doentes com psoríase	84
Figura 8 - Relação entre os títulos de anticorpos IgG anti-HDL e anti-ApoE e a gravidade da psoríase	85
Figura 9 – Efeito da adição de IgG aHDL e de IgG humana inespecífica no bloqueio da expressão de VCAM-1 em células endoteliais de veia umbilical humana estimuladas por TNF- α	95
Figura 10 – Efeito da adição de IgG aHDL e de IgG humana inespecífica no bloqueio da expressão de ICAM-1 em células endoteliais de veia umbilical humana	96

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais funções ateroprotectoras das HDL	53
Tabela 2. Principais alterações de HDL associadas a psoríase	61
Tabela 3. Características demográficas e clínicas e perfil lipídico de controlos (CTRL) e doentes com psoríase (PSO).	78
Tabela 4. Variáveis biológicas (títulos de anticorpos, marcadores de oxidação e de inflamação) em controlos (CTRL) e em doentes com psoríase (PSO).	83
Tabela 5: Análise univariável geral	87
Tabela 6: Análise univariável do grupo psoríase	88
Tabela 7: Análise univariável do grupo controlo	89
Tabela 8: Modelo multivariável só com grupo e anticorpos	90
Tabela 9: Modelo multivariável só com anticorpos no grupo com psoríase	90
Tabela 10: Modelo multivariável só com anticorpos no grupo controlo	91
Tabela 11: Modelo multivariável geral	91
Tabela 12: Análise de regressão linear multivariável estratificada por grupo	92
Tabela 13: Factores de risco para aterosclerose: tradicionais e relacionados com auto-imunidade	98

Este estudo foi financiado pelo “Pfizer R&D’S Investigator-Initiated Research Program”

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor José Delgado Alves, meu orientador, agradeço a confiança que depositou em mim desde o primeiro momento em que, sua total desconhecida, lhe fui dizer que gostaria de investigar a presença de anticorpos anti-HDL em doentes com psoríase, ainda sem saber muito bem de que forma poderia fazê-lo. Foi preciosa a sua orientação para o desenho do projecto e fundamental o seu apoio para a concretização. Não menos importante, o entusiasmo e alegria que imprime ao trabalho científico e a vívida discussão de todas as etapas.

À Doutora Joana Batuca por todo o trabalho laboratorial que fez e que me ensinou, pacientemente, a executar e compreender. Exercendo clínica há mais de 20 anos, não me foi fácil enfrentar a bancada. Foi muito útil o estágio que fiz com a Doutora Joana Batuca, o qual me ajudou a familiarizar-me com algumas técnicas e instrumentos e com os seus métodos de trabalho. O reconhecimento das dificuldades metodológicas e dos possíveis factores de erro foi também fundamental.

À Prof. Doutora Ana Papoila e à Dra. Marta Alves, agradeço o trabalho de análise estatística e a disponibilidade para esclarecer as minhas frequentes dúvidas. À restante equipa do Centro de Investigação do CHLC, em particular ao Dr. Daniel Virella, pela colaboração na fase inicial do projecto.

À Dra. Sofia Gouveia, interna do Serviço de Imunohemoterapia do CHLC, que fez todo o trabalho de recrutamento e caracterização clínica do grupo de controlo.

À responsável pelo serviço de Dermatologia do CHLC, Dra. Margarida Apetato, por me ter dado alguma latitude, permitindo-me tempo para a investigação. Também agradeço a todos os colegas do serviço que colaboraram e me ajudaram em diferentes ocasiões.

À Prof. Doutora Elisa Campos, pela inesgotável disponibilidade, confiança e amizade. Foi a primeira pessoa que me incentivou e apoiou neste percurso, que acompanhou a cada passo, com preciosas críticas e sugestões.

Às técnicas do laboratório de patologia clínica do CHLC, Leonor Miranda, Fátima Silva e Fernanda Serejo, que fizeram as colheitas, a centrifugação e o congelamento dos soros. A todas as enfermeiras da consulta externa de Dermatologia, sempre disponíveis para colaborar.

Agradeço, naturalmente, à minha família e aos meus amigos, por serem como são.

Finalmente, mas não menos importante, agradeço a todos os participantes, doentes e dadores de sangue, que generosamente permitiram que o estudo se realizasse.

Abreviaturas

aApoA-I	Anti-apoproteína A-I
aApoE	Anti-apoproteína E
ApoA-I	Apoproteína A-I
ApoA-II	Apoproteína A-II
ApoE	Apoproteína E
ABCA1	<i>Adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1</i>
ABCG1	<i>Adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1</i>
aHDL	Anti-lipoproteínas de alta densidade
aPON1	Anti-paraoxonase 1
AVC	Acidente vascular cerebral
BIC	Tampão bicarbonato
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCL2	<i>Chemokine ligand 2</i>
CCL20	<i>Chemokine ligand 20</i>
CE	Ésteres de colesterol
CETP	<i>Cholesterol ester transfer protein</i>
COX-2	Ciclooxigenase 2
CTRL	Controlo saudável
CV	Cardiovascular
CXCL1	<i>Chemokine ligand 1</i>
CXCL3	<i>Chemokine ligand 3</i>
CXCL8	<i>Chemokine ligand 8</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico

EAM	Enfarte agudo do miocárdio
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbant assay</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
E-selectina	Selectina E ou molécula de adesão celular endotelial
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HDL-C	Colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidade
HLA	Antigénio leucocitário humano
HSP	Proteínas de choque térmico
HTA	Hipertensão arterial
HUVECs	Células endoteliais de veia umbilical humana
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IDL	Lipoproteínas de densidade intermédia
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-16	Interleucina 16
IL-17	Interleucina 17
9IL-17R	Receptor de Interleucina 17

IL-18	Interleucina 18
IL-23	Interleucina 23
INF- α	Interferão α
INF- γ	Interferão γ
LCAT	<i>Lecithin cholesterol acyltransferase</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor de LDL
LES	Lupus eritematoso sistémico
LL37	Péptido antimicrobiano derivado de catelicidina
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LPS	Lipopolisacárido
LRP	Proteína Relacionada com o receptor LDL
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
M-CSF	Factor estimulador de colónias de macrófagos
MHC	Complexo major de histocompatibilidade
miRNA	Micro RNA
MMP9	Metalopeptidase de matriz 9
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form</i>
NF- κ B	Factor de transcrição nuclear κ B
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
OR	<i>Odds-ratio</i>
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PAF-AH	<i>Platelet Activating Factor Acetylhydrolase</i>
PASI	<i>Psoriasis Area and Severity Index</i>

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Proteína C reactiva
PDZK1	<i>PDZ domain containing 1</i>
PGI ₂	Prostaciclina
PI ₃ K	<i>phosphoinositol-3-kinase</i>
PLOOH	Hidroperóxidos fosfolipídicos
PLTP	Proteína de transferência de fosfolípidos
PON ₁	Paraoxonase 1
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
RR	Risco relativo
SAA	Amilóide sérico A
SAF	Síndrome de anti-fosfolípidos
SiP	<i>Sphingosine 1-Phosphate</i>
SR-BI	<i>Scavenger receptor class B type I</i>
TGF-β	Factor de transformação do crescimento β
Th	<i>T helper</i>
Th ₁	<i>T helper 1</i>
Th ₂	<i>T helper 2</i>
Th ₉	<i>T helper 9</i>
Th ₁₇	<i>T helper 17</i>
Th ₂₁	<i>T helper 21</i>
Th ₂₂	<i>T helper 22</i>
Th ₂₃	<i>T helper 23</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>

TLR ₂	<i>Toll like receptor 2</i>
TLR ₄	<i>Toll like receptor 4</i>
TLR ₈	<i>Toll like receptor 8</i>
TNF- α	Factor de necrose tumoral α
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular 1
VEGF	Factor de crescimento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

Preâmbulo

Esta tese baseia-se no estudo da relação entre duas patologias que só muito recentemente se encontraram associadas na literatura médica, psoríase e aterosclerose. Qualquer delas é alvo de estudo intenso, encontrando-se na *pubmed* mais de quarenta mil referências na pesquisa por “psoriasis” e mais de cento e vinte mil na pesquisa por “atherosclerosis”.

A associação entre estas duas patologias está claramente relacionada com a natureza imunomediada de ambas, estando bem descritas as semelhanças entre os processos inflamatórios e oxidativos crónicos que lhes subjazem.

Tratando-se de temas muito vastos, seria possível optar por outras abordagens de investigação. A escolha de estudar a resposta humoral contra HDL nos doentes com psoríase foi motivada pela sua inequívoca importância na patogénese da aterosclerose e pelo carácter fascinante destas partículas, dotadas de grande variabilidade e capacidade única de adaptação às modificações do meio, extremamente rápida, de forma que as alterações de superfície das partículas de HDL conduzem a alterações imediatas das suas capacidades funcionais. Escolhi especificamente estudar a presença de anticorpos anti-HDL em doentes com psoríase porque me pareceu conceptualmente plausível que os processos inflamatórios e oxidativos crónicos presentes na psoríase fossem capazes de induzir alterações estruturais em proteínas e exposição de novos epitopos em moléculas de superfície das HDL, em particular em apoproteínas. O nosso grupo de investigação tinha já descrito e caracterizado anticorpos anti-HDL noutras patologias, como *lupus eritematoso sistémico* (LES), *síndrome de antifosfolípidos* (SAF) e diabetes. Tínhamos, portanto, uma parte da metodologia já testada (embora em condições diferentes), o que aumenta o grau de confiança quanto ao rigor e validade dos resultados obtidos. A abordagem transversal procurando “pontes” em áreas da medicina aparentemente tão diferentes constituiu um desafio importante, não só pela

mudança implícita no paradigma fisiopatológico associado a cada uma destas doenças, como pela necessidade de rever algumas metodologias e desenvolver outras. Consegui assim, aumentar consideravelmente o número de questões por responder...

No capítulo de resultados, além de se detalhar os resultados clínicos, laboratoriais (das análises bioquímicas e imunológicas e dos estudos funcionais), e de análise estatística, faz-se a discussão parcelar de cada subcapítulo, em benefício da maior clareza e melhor organização de argumentos. Desta forma, a discussão global deste projecto é constituída não só pelo capítulo chamado discussão final, mas também pelas discussões parcelares anteriores.

A discussão final contem a súmula e integração da discussão de todos os resultados obtidos, assim como as limitações desta investigação.

Resumo

A psoríase é uma doença imunomediada que atinge cerca de 2-3% da população, o que a torna a doença inflamatória crónica mais prevalente na humanidade.

Durante muito anos foi considerada uma doença quase exclusivamente cutânea, que poderia em alguns casos associar-se a artrite. Hoje reconhece-se a existência de várias importantes comorbilidades associadas à psoríase, como diabetes tipo II, dislipidémia, hipertensão arterial, obesidade, perturbações do humor, síndrome metabólico, aterosclerose subclínica e doença cardiovascular, compreendendo doença arterial coronária e acidente vascular cerebral. Em consequência, regista-se uma grave diminuição da qualidade de vida e um elevado impacto socioeconómico.

O reconhecimento destas associações levou a um enorme desenvolvimento da investigação nesta área, procurando esclarecer os mecanismos envolvidos. Contudo, apesar dos importantes progressos registados, a relação da psoríase com as suas comorbilidades associadas não está ainda totalmente esclarecida.

O aumento do risco de doença cardiovascular na psoríase está relacionado com a maior prevalência de factores de risco cardiovascular clássicos nestes doentes, como dislipidémia, hipertensão arterial e aumento do índice de massa corporal. Mas sobretudo, é de salientar que a psoríase é um factor de risco independente para doença cardiovascular, tão relevante que a sua inclusão no Framingham Risk score conduziria a uma correção da classe de risco na maioria dos doentes, com consequências práticas nas estratégias de prevenção e terapêutica recomendadas.

Na psoríase estão bem caracterizados processos oxidativos e inflamatórios crónicos muito semelhantes aos que ocorrem na aterosclerose, contribuindo para a evolução paralela destas duas patologias, culminando com a formação de placas inflamatórias na pele e na íntima arterial, respectivamente.

O nosso grupo de investigação tinha já identificado anticorpos anti-HDL em doenças auto-imunes e não auto-imunes associadas a risco aumentado de doença cardiovascular, como LES, SAF e diabetes tipo 2, relacionando estes anticorpos com a perturbação das funções protectoras das HDL.

Este projecto foi desenvolvido para investigar a eventual existência de resposta humoral contra lipoproteínas de alta densidade em doentes com psoríase, contribuindo para o esclarecimento de um mecanismo explicativo da associação entre psoríase e aterosclerose e potencialmente para a identificação de um biomarcador que permitisse identificar precocemente os doentes com psoríase em maior risco cardiovascular.

Foram estudados 67 doentes consecutivos com o diagnóstico de psoríase vulgar e 50 dadores de sangue saudáveis, com idêntica distribuição por idade e sexo. Nestes dois grupos fez-se o registo de parâmetros epidemiológicos e clínicos. Foram medidos por ELISA os títulos de anticorpos IgG e IgM anti-HDL (aHDL), os níveis de IgG anti-apoproteína A-I (aApoA-I), anti-paraoxonase 1 (aPON1) e anti-apoproteína E (aApoE) e também os níveis de VCAM-1, IL-6 e TNF- α .

O perfil lipídico foi determinado por técnicas enzimáticas padrão.

Os níveis de apoproteínas A-I (ApoA-I) e E (ApoE) foram medidos por imunoturbidimetria. Avaliou-se a actividade da paraoxonase 1 (PON1) pela quantificação da formação de nitrofenol, por espectrometria. Os metabolitos do óxido nítrico (NO) foram determinados pela reacção de Griess.

A actividade biológica dos anticorpos IgG aHDL foi avaliada *in vitro* pelo bloqueio da expressão de VCAM-1 e ICAM-1 em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs).

A análise estatística mostrou que os dois grupos são comparáveis em termos de idade e sexo. Nos doentes com psoríase havia maior índice de massa

corporal ($p=0.043$), história de HTA ($p=0.005$), de doença cardiovascular ($p=0.07$), de diabetes ($p=0.07$) e de dislipidemia ($p<0.001$).

Verificámos que os doentes com psoríase têm títulos mais elevados de IgG aHDL ($p<0.001$) mas não de IgM aHDL. Têm também níveis mais elevados de IgG aApoA-I ($p=0.001$) e de IgG aApoE ($p<0.001$). Existe uma correlação positiva entre os títulos de IgG aHDL e aApoA-I ($r_s=0.42$, $p<0.001$) e de aApoE ($r_s=0.339$, $p<0.001$). Os títulos destes anticorpos são mais elevados nos doentes com psoríase grave, definida como *baseline* PASI >10 , atingindo significado estatístico nos IgG aHDL ($p=0.010$) e aApoE (0.018). Não há correlação entre os títulos de anticorpos e a idade ou a duração da doença. Não se registou diferença nos níveis de aPON₁, entre doentes e controlos.

Os doseamentos de apoproteínas revelaram aumento de ApoE ($p=0.031$) e redução de ApoA-I ($p<0.001$) nos doentes com psoríase.

Não se verificaram diferenças entre os grupos quanto aos marcadores de inflamação e oxidação.

O estudo funcional *in vitro* mostrou que os IgG aHDL dos doentes com psoríase são capazes de bloquear o efeito inibitório das HDL na expressão de VCAM-1, em células endoteliais estimuladas por TNF- α .

Foi efectuada uma extensa análise de regressão univariável e multivariável para identificar as variáveis independentes (clínicas, bioquímicas ou imunológicas) ou modelos de variáveis que melhor explicavam a variabilidade dos títulos de aHDL (variável dependente). Concluimos que o modelo que melhor explica essa variabilidade é constituído pelas variáveis grupo de estudo (grupo com psoríase ou grupo controlo), aApoE, Il-6 e aPON₁. Este modelo tem um R^2 de 0.402, ou seja, explica 40.2% da variabilidade dos valores de aHDL.

Este é o primeiro estudo que mostra a existência de IgG aHDL e aApoA-I em doentes com psoríase. É também a primeira vez que se identificam anticorpos aApoE associados a psoríase ou a qualquer patologia humana.

Estes anticorpos são mais elevados na psoríase grave e têm capacidade de bloquear o efeito anti-inflamatório das HDL *in vitro*, o que sugere fortemente o seu papel patogénico.

Concluimos que esta investigação sugere uma nova explicação mecanística para a associação entre psoríase e aterosclerose e também novos candidatos a biomarcadores de risco cardiovascular na psoríase que permitirão a estratificação do risco, orientando as atitudes de vigilância e as intervenções terapêuticas.

Abstract

Psoriasis is an immunomediated disease with a prevalence of 2-3%. It is the most prevalent chronic inflammatory disease in humans.

Historically it was considered as a disease affecting only the skin, and sometimes the joints. However, in the last decades the association of psoriasis with various comorbidities was recognized. These include type II diabetes, hypertension, dyslipidemia, obesity, anxiety, depression, metabolic syndrome, subclinical atherosclerosis and cardiovascular disease (coronary artery disease and cerebrovascular disease). These comorbidities cause a considerable negative socioeconomical impact as well as loss of quality of life.

Despite intensive investigation the causes and mechanisms of such associations are yet to be clarified.

Psoriasis is associated with classic risk factors for cardiovascular disease but it is also an independent risk factor. It's inclusion on the Framingham Risk score would lead to the reassignment of most psoriasis patients to a higher risk class, hence to actual changes in the therapeutic strategies and goals for these patients.

The chronic inflammatory and oxidative processes occurring in psoriasis are very similar to those underlying atherosclerosis and are certainly implicated in the pathogenesis of the psoriatic plaques on the skin and the atheroma plaques on the arteries, with a parallel evolution.

Our group had previously identified anti-HDL antibodies in autoimmune and non-autoimmune diseases, e.g., lupus erythematosus and type 2 diabetes, and associated these antibodies with a hampered HDL function.

This project aimed at investigating the presence of anti-HDL antibodies in patients with psoriasis, suggesting a new mechanistic explanation for the association between psoriasis and atherosclerosis as well as providing

potential biomarkers for the assessment of cardiovascular risk in these patients.

We enrolled 67 consecutive patients with plaque psoriasis from our outpatient clinic, as well as 50 healthy blood donors with matching age and sex. Epidemiologic and clinical data were recorded. IgM and IgG anti-HDL (aHDL), anti-apolipoprotein A-I (aApoA-I), anti-apolipoprotein E (aApoE) and anti-paraoxonase 1 (aPON₁) antibodies as well as vascular adhesion molecules (VCAM-1), Il-6 and TNF- α were assessed by ELISA. The plasma lipid profile was determined by standard enzymatic techniques. Apolipoprotein A-I (ApoA-I) and Apolipoprotein E (ApoE) were measured by immunoturbidimetric assays. Paraoxonase 1 (PON₁) activity was assessed by quantification of nitrophenol formation by spectrophotometry. Nitric oxide metabolites (NO_x) were measured using the Griess reaction. The biologic activity of the antibodies was assessed *in vitro* by the blockade of HDL inhibition of VCAM-1 expression on HUVECs previously stimulated with TNF- α .

In the psoriasis group we found elevated BMI ($p=0.043$), hypertension ($p=0.005$), cardiovascular disease ($p=0.07$), diabetes ($p=0.07$) and dyslipidemia ($p<0.001$).

Patients with psoriasis had higher titres of IgG (but not IgM) aHDL ($p<0.001$). They also had higher IgG aApoA-I ($p=0.001$) and aApoE antibodies ($p<0.001$). IgG aHDL antibodies titres directly correlated with aApoA-I antibodies ($r_s=0.432$, $p < 0.001$) and aApoE antibodies ($r_s=0.339$, $p<0.001$). Patients with severe psoriasis, defined as baseline PASI >10 , had higher IgG aHDL and aApoE titres ($p=0.010$ and $p=0.018$, respectively) but there was no association with age or disease duration. There was no statistical difference in aPON₁ levels between patients and controls.

Regarding apoprotein levels, patients had increased ApoE ($p=0.031$) and decreased ApoA-I ($p<0.001$) levels.

There were no differences in inflammation or oxidation markers.

The functional *in vitro* study performed in HUVECs stimulated with TNF- α , showed that IgG aHDL isolated from patients were capable of blocking the inhibitory effect of HDL on the expression of VCAM-1 in the endothelium.

To my knowledge, this is the first report showing the presence of aHDL and aApoA-I antibodies in patients with psoriasis. It is also the first report of aApoE in psoriasis and in human pathology.

These antibodies were associated with increased disease severity and they block the anti-inflammatory effect of HDL *in vitro*, which strongly suggest they may play a role in the pathogenesis of atherosclerosis in psoriasis. They may also fulfil the clinical need for biomarkers of cardiovascular risk associated with psoriasis that would help to stratify patients for future prevention and therapeutic approaches.

Introdução

Psoríase

A psoríase é uma doença descrita desde a antiguidade. Foi considerada como uma forma de Lepra, até que Hebra (1816-1880) a descreveu como uma entidade nosológica autónoma, em 1841.

Clinicamente pode apresentar-se em várias formas. A psoríase vulgar, ou em placas, é a forma mais frequente, correspondendo a cerca de 80% do total. Caracteriza-se pela presença de placas eritematodescamativas bem delimitadas, com grau variável de infiltração, com escama tipicamente esbranquiçada ou prateada, habitualmente assintomáticas, embora por vezes moderadamente pruriginosas, localizadas sobretudo nos cotovelos, joelhos e couro cabeludo, podendo, contudo, disseminar para qualquer área do tegumento. Em contraste, alguns doentes têm placas em áreas intertriginosas, como pregas axilares, inguinais ou infra-mamárias, mais eritematosas e menos descamativas, no que se designa como psoríase inversa. A psoríase gutata surge sobretudo em jovens, tipicamente após uma infeção respiratória superior por estreptococos β -hemolítico do grupo A, caracterizando-se por placas mais pequenas e numerosas, dispersas no tegumento, sobretudo no tronco. As lesões palmoplantares podem representar uma outra forma de psoríase (psoríase palmoplantar) ou coexistir com lesões noutras áreas; podem ser hiperqueratósicas ou pustulosas. A psoríase pustulosa pode ser localizada ou generalizada (von Zumbush), neste caso tratando-se de uma forma muito grave, agudamente inflamatória, associada a sintomas sistémicos e constituindo indicação para internamento¹. A psoríase pode ser causa de eritrodermia, quando interessa mais de 90% da superfície corporal; também nesta forma pode condicionar sintomas sistémicos e eventual internamento.

A psoríase ungueal pode surgir em qualquer das formas descritas, transitória ou cronicamente, e está associada a entesite.

A psoríase tem evolução clínica imprevisível e um doente pode, ao longo dos anos, ter manifestações de qualquer dos tipos descritos.

Epidemiologia

A prevalência da psoríase é habitualmente referida entre 2 e 3% na Europa. Na população pediátrica foram descritas prevalências variando entre 0 e 2.1% (Itália) e em adultos referem-se valores entre 0.91%, nos EUA, e 8.5% na Noruega². Parte desta variabilidade é explicada por diferenças metodológicas, pois alguns estudos são baseados em observação clínica e outros são conduzidos por questionários aplicados à população, sem confirmação do diagnóstico por observador. Este foi o caso do estudo que registou o valor mais elevado na Noruega. Dos estudos com observação, os valores mais altos foram descritos na Dinamarca (2.8%) e nas ilhas Faroe (2.9%). Nos EUA a prevalência parece ser semelhante à da Europa, embora seja menor na população afroamericana. Na Ásia, a prevalência de psoríase é menor do que na Europa, com valores entre 0.3 e 1.2%. Em África, os poucos estudos existentes indicam uma prevalência maior na costa oriental (2%) e menor na costa ocidental (0.3%), o que poderá estar associado à menor prevalência em afroamericanos, pois os seus antepassados vieram maioritariamente dos países da África ocidental³.

Salienta-se que a epidemiologia da psoríase não tem sido alvo de estudos populacionais em larga escala, baseando-se as taxas de prevalência expressas na literatura sobretudo em estimativas, faltando estudos longitudinais que informem sobre a evolução da prevalência no tempo, ao contrário do que se passa com outras doenças auto-imunes⁴.

Genética

A psoríase resulta da interacção complexa entre diversos factores genéticos e ambientais. Pode ter diferentes expressões fenotípicas, partilhando aspectos anatomopatológicos característicos⁵. Classicamente, distingue-se a psoríase de tipo I e de tipo II⁶, sendo que o tipo I representa cerca de 60% da população com psoríase, tem um início mais precoce da doença, com história familiar positiva e mais frequentemente expressa HLA-Cw*0602. Este locus, pertencente à região MHC no cromossoma 6, é designado “psoriasis susceptibility 1”(PSORS1) e é considerado o mais importante na psoríase, encontrando-se em aproximadamente 50% dos doentes. Não obstante, vários outros loci têm vindo a ser descritos, localizados noutros cromossomas (portanto não relacionados com o MHC). Actualmente estão identificadas 45 regiões cromossómicas de susceptibilidade⁷. Muitas destas variantes genéticas, identificadas por “genome-wide association studies”, estão relacionadas com importantes efeitos imunológicos, nomeadamente ao nível de sinalização e diferenciação de linfócitos T, eixo IL-23/Th17 e via de activação NF- κ B^{7,8}.

Em doentes com antecedentes de psoríase em ambos os progenitores, a frequência da doença nos irmãos será de 50%, caindo para 16% se só um progenitor for afectado e para 8% se nenhum progenitor manifestar a doença⁹. Um estudo que analisou uma série de 1262 crianças com psoríase, na Austrália, concluiu que havia história familiar positiva para Psoríase em 71% dos doentes¹⁰. Num estudo sobre a incidência em gémeos verificou-se que os gémeos homozigóticos de doentes com psoríase têm um risco de desenvolver psoríase 3 vezes superior ao risco dos gémeos dizigóticos¹¹.

A interacção dos factores genéticos com factores ambientais é determinante na evolução da doença, referindo-se como mais relevantes a exposição a radiação ultravioleta, tabagismo, obesidade, stress, infecções e fármacos como anti-inflamatórios não esteróides, antimaláricos, β -bloqueantes, lítio,

inibidores do enzima de conversão da angiotensina, interferons α e γ e imiquimod³.

Fisiopatologia

Entendida durante décadas como uma doença da queratinização, só os recentes avanços do conhecimento no campo da imunologia básica e clínica, ainda hoje em franco desenvolvimento, permitiram a actual classificação da psoríase como uma doença inflamatória sistémica, crónica, imunomediada. Este conceito da patogénese imune da psoríase foi inicialmente sugerido pela observação dos efeitos benéficos da ciclosporina em doentes com psoríase¹² e desenvolveu-se sobretudo após os trabalhos de Gottlieb, demonstrando que a inibição da IL-2 e a consequente inibição da proliferação de linfócitos T activados resultava em melhoria das lesões de psoríase dos doentes, acompanhando-se de uma redução de células CD3⁺ e CD8⁺ intraepidérmicas¹³.

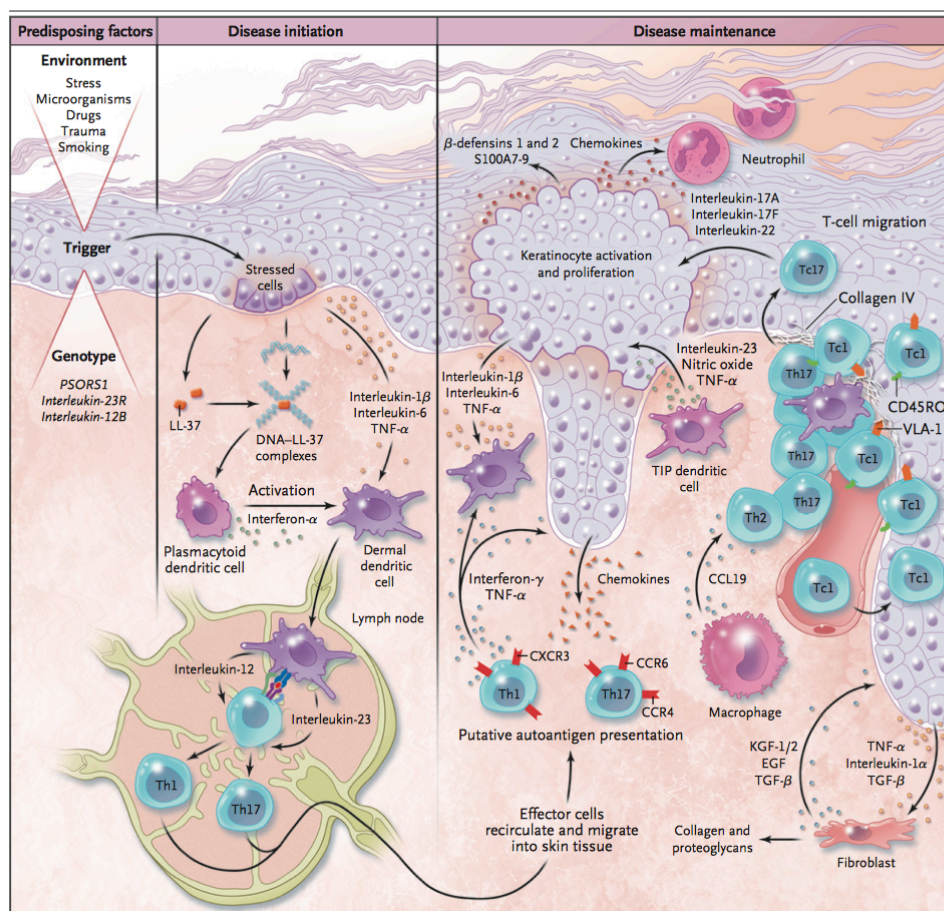
O entendimento actual sobre a patogénese da psoríase é o de que se trata de uma doença em que respostas imunológicas diversas (envolvendo diferentes citocinas e linhagens celulares, como queratinócitos, células dendríticas plasmocitóides e mielóides, células endoteliais, linfócitos T e B e monócitos) interagem num ambiente angiogénico, de forma dinâmica^{14,15}.

Existe controvérsia sobre se se trata de uma doença auto-imune, sendo aceite que pertence ao espectro de doenças relacionadas com auto-imunidade¹⁶; na investigação sobre possíveis autoantígenos, está descrita a perda de “*self-tolerance*” demonstrada pela activação de células dendríticas plasmocitóides após exposição a DNA do *self* ligado a um péptido antimicrobiano (LL-37), formando um complexo que activa um *Toll-like receptor*¹⁷. Anteriormente, em 1999, tinha sido posta a hipótese de um epitopo da queratina-17 poder funcionar como alvo de linfócitos T auto-reactivos¹⁸. Um estudo de 2017 contrapõe que a ausência de depósitos observáveis em imunofluorescência

directa, assim como a ausência de autoanticorpos séricos, são argumentos contra a hipótese auto-imune¹⁹.

As interacções entre os vários intervenientes da imunidade inata e adaptativa e os seus ciclos de perpetuação são fundamentais no entendimento da psoríase e a compartimentação destes intervenientes, sendo útil para a exposição, não deve obscurecer o carácter dinâmico do processo, em que o conjunto dos participantes é essencial, conforme ilustra a figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática da fisiopatologia da psoríase



As lesões iniciais de psoríase são desencadeadas pela interacção entre factores genéticos e ambientais. Estímulos como traumatismos ou infeção bacteriana levam à formação de complexos LL-37/DNA, activação de células dendríticas plasmocitoides e produção de INF- α . As células dendríticas mielóides activadas migram para os gânglios linfáticos aferentes onde induzem a diferenciação de linfócitos T *naïve* em linfócitos T activados. Estes linfócitos, que entram na circulação e migram para a pele por ligações com selectinas e integrinas (VLA-1/colagénio IV), expressam CCR6, CCR4 e CXCR3. O processo é perpetuado pela produção de IL23 por células dendríticas da derme, de óxido nítrico e TNF- α pelas células dendríticas TIP, de IL-17A, IL-17F e IL-22 pelas células Th17 e de TNF- α e INF- γ pelas células Th1. Estes mediadores levam a activação de queratinócitos que produzem LL-37, β -defensinas, CXCL1, CXCL9, CXCL11, CCL20 e proteínas S100A7-9. Os neutrófilos são atraídos pelas quimiocinas CXCL1 e CXCL8. Ciclos de activação envolvendo queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos contribuem para a reorganização tecidual, com angiogénese e deposição de matriz extracelular (Reproduzido com autorização de Nestle et al 2009²⁰ Copyright Massachusetts Medical Society)

Queratinócitos

Os queratinócitos constituem 95% da massa celular da epiderme. Para além do seu papel de barreira mecânica, eles são parte integrante do sistema imunológico inato. O seu papel como iniciadores de inflamação foi descrito em 1991²¹ e desde então foi largamente demonstrado. Os queratinócitos podem ser activados por vários estímulos, mecânicos ou químicos. São exemplos de estímulos mecânicos a activação para reparação de feridas cutâneas e o fenómeno de Köebner; os estímulos químicos podem ser citocinas ou factores de crescimento. Este ciclo de activação de queratinócitos é importante na manutenção da homeostasia, por exemplo nos processos de reparação/cicatrização, mas está alterado na psoríase, observando-se proliferação de queratinócitos com deficiente maturação²².

Os queratinócitos activados são capazes de produzir vários mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-6, IL-16, IL-18, TNF- α , TGF- β ou VEGF. Estas citocinas estão relacionadas com a angiogénese e a activação de células endoteliais que expressam ICAM-1, E-selectina, VCAM-1 e MHC classe II⁹. Os capilares tornam-se dilatados e com maior permeabilidade, em consequência do aumento de produção de óxido nítrico. Estas características, no seu conjunto, são relevantes para a capacidade de recrutamento de linfócitos circulantes para o seu “local de trabalho”. Em modelo animal, demonstra-se que a sobre-expressão de VEGF está associada a angiogénese e ao desenvolvimento de um fenótipo psoriasiforme²³.

As citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-18, TNF- α e INF- γ são indutoras de peptídeos antimicrobianos (e.g., defensinas β 1/2, S100A7-9), catelicidinas (LL-37) e lectinas tipo C. Estas moléculas funcionam também como opsoninas, quimiocinas e mediadores imunológicos⁸. Em particular, a ligação de IL-17A ao seu receptor nos queratinócitos, leva ao aumento de produção de várias citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 e ao aumento da expressão de β -defensina 2, outros péptidos antimicrobianos e CCL20²⁴.

Finalmente, a interacção entre a imunidade inata e adaptativa é fundamental para a iniciação e perpetuação das lesões de psoríase^{8,25} e os queratinócitos têm um papel central nesta interacção.

Células dendríticas

As células apresentadoras de antígenos estabelecem uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa. As células dendríticas plasmocitóides não se observam habitualmente em pele normal, porém encontram-se na pele de doentes com psoríase, quer em placas lesionais, quer em pele aparentemente sã. Elas são produtoras de INF- α e podem responder a estímulos infecciosos mas também a complexos de LL-37 e *self*-DNA, resultantes de activação queratinocítica e com capacidade para se ligarem a TLRs¹⁷.

As células dendríticas mielóides são estimuladas pelas células dendríticas plasmocitóides e pelos queratinócitos activados e são responsáveis pela amplificação da resposta imunológica. Complexos de LL-37 e *self*-RNA são capazes de se ligar ao TLR8, activando células dendríticas mielóides que produzem IL-6 e TNF- α , tornando-se maduras²⁶. As células dendríticas TIP (TNF- α and inducible nitric oxide synthase-producing) são mais provavelmente uma fase de transição das células dendríticas, expressando diversos genes por activação imunológica, do que uma verdadeira classe de células dendríticas²⁷. Estas células TIP são importantes na patogénese da psoríase pois além de TNF- α e óxido nítrico são também libertadoras de IL-12 e IL-23, fundamentais para a diferenciação das linhagens Th1 e Th17, respectivamente²⁸.

Linfócitos

Os linfócitos têm um papel fundamental na psoríase, sendo os responsáveis pela produção e orquestração das citocinas envolvidas nos processos inflamatórios e pela activação de várias linhagens celulares que conduzem às

lesões clínicas. Os linfócitos Th17, Th1 e Th22 parecem ser os mais relevantes neste contexto.

Admite-se que o processo se inicie quando as células apresentadoras de antígenos migram para gânglios aferentes onde apresentam o seu antígeno, previamente processado e ligado a moléculas do MHC, a células T *naïve*, na presença de moléculas co-estimulatórias, levando à diferenciação e expansão de linfócitos T de memória que expressam o antígeno de localização cutânea: linfócitos T CD45RO+CLA⁺⁹. Durante vários anos considerou-se que os linfócitos Th1, produtores de INF- γ , eram as principais células efectoras na psoríase; actualmente, porém, importância crescente tem sido atribuída às linhagens Th17 e Th22, mais recentemente descritas²⁹.

As células Th1 parecem ter um papel nas fases mais precoces da patogénese, pois induzem a produção de CCL20 (ligando de CCR6) e IL-23 por células dendríticas mielóides, levando assim à estimulação do eixo IL-23/Th17. As células Th17 produzem IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-9, promovendo uma resposta inflamatória de neutrófilos e queratinócitos e estimulando a produção de péptidos antimicrobianos, citocinas e quimiocinas como CCL20, CXCL1, CXCL3 e CXCL8³⁰. Este processo cria um ciclo de autoalimentação inflamatória, envolvendo imunidade inata e adaptativa, que mantém e amplifica o processo inflamatório crónico.

Os linfócitos Th22 são células residentes na pele, produtoras de IL-22, TNF- α e IL-13. Na psoríase, estão envolvidas na proliferação de queratinócitos, conducente à característica acantose da epiderme, e também na memória tecidual em locais de lesões recorrentes.

Os linfócitos Th9 são células com tropismo para a pele capazes de induzir a produção de IFN- γ , IL-17 e IL-13 por células Th1, Th2 e Th17 CLA⁺. Foi ainda proposto um papel sinérgico de linfócitos Th21 na proliferação de queratinócitos e na manutenção do processo inflamatório³⁰.

Macrófagos, neutrófilos, mastócitos

O papel destas linhagens celulares na patogénese da psoríase está menos esclarecido do que o das anteriormente descritas.

Os macrófagos são uma importante fonte de TNF- α e têm também um papel na angiogénese, através da libertação de proteases e factores de crescimento, como o VEGF. Também os mastócitos produzem TNF- α , IFN- γ , IL-8 e VEGF, contribuindo para um ambiente pró-inflamatório e o consequente recrutamento de neutrófilos e linfócitos³¹.

Os neutrófilos aparecem desde as fases iniciais da psoríase a infiltrar a epiderme, formando por vezes aglomerados, chamados micro-abcessos de Munro. Para além de sua capacidade de recrutamento e activação de células inflamatórias e activação de queratinócitos, também são importantes os produtos libertados na desgranulação de neutrófilos, como citocinas, proteases (elastase) e proteínas catiónicas (lactoferrina). A elastase estimula a proliferação de queratinócitos e activa os receptores de factor de crescimento epidérmico, contribuindo assim para a expansão das placas de psoríase. Esta protease estimula também outras células inflamatórias e mantém o ciclo de activação de neutrófilos. Este processo é regulado por duas proteínas de fase aguda, α_1 -antitripsina e α_2 -macroglobulina. A lactoferrina promove a adesão de neutrófilos a células endoteliais e constitui um elo entre a imunidade inata e a adaptativa, pois modula a libertação de citocinas e a resposta de células alvo^{31,32}.

Psoríase e comorbilidades

Durante décadas a psoríase foi considerada uma doença quase exclusivamente cutânea, reconhecendo-se a artrite como comorbilidade associada numa minoria de doentes. Actualmente, reconhece-se que várias outras comorbilidades estão associadas à psoríase de forma significativa, incluindo perturbações psiquiátricas³³, doença renal³⁴, diabetes tipo II, dislipidémia, obesidade, síndrome metabólico e doença cardiovascular (CV)³⁵. Daqui resulta um impacto grave para a qualidade de vida dos doentes e das suas famílias, condicionando as suas opções de vida e laborais, com efeitos cumulativos ao longo da vida³⁶. Também o rendimento familiar é afectado negativamente pela psoríase, de forma dependente da gravidade da doença³⁷.

Além do sofrimento individual e familiar que causam, estas comorbilidades constituem um fardo socioeconómico, aumentando consideravelmente os custos sociais associados à psoríase³⁸. Estes custos têm tendência crescente, em virtude do advento das novas terapêuticas biotecnológicas, muito eficazes mas onerosas e não curativas, portanto de utilização prolongada^{39,40}. Os custos indirectos, por perda de produtividade, são também muito relevantes, podendo até superar os custos directos⁴¹.

Psoríase e doença cardiovascular

A associação entre psoríase e doença CV foi inicialmente descrita em 1961, num estudo que encontrou aumento da prevalência de enfarte agudo do miocárdio (EAM) e trombose coronária em autópsias de doentes com artrite psoriásica⁴². Todavia, passaram-se décadas até que este assunto fosse alvo de interesse e de investigação sistemática, revelando o aumento de prevalência de factores de risco CV e da incidência de eventos CV nestes doentes.

Actualmente, vários estudos epidemiológicos mostram que a psoríase é um factor de risco independente para doença CV, mesmo depois de ajustar a análise aos diferentes factores de risco CV conhecidos.

O primeiro estudo que demonstrou que a psoríase é um factor de risco independente para EAM, depois de ajustada a análise para hipertensão arterial (HTA), diabetes, antecedentes de EAM, hiperlipidemia, idade, sexo, tabagismo e índice de massa corporal (IMC), foi realizado no Reino Unido, incluindo 130 976 doentes com psoríase (127139 com psoríase ligeira e 3837 com psoríase grave), registados no “*General Practice Research Database*” entre 1987 e 2002. Reportava um risco relativo maior em doentes jovens (30 anos) do que nos que tinham idade superior a 60 anos; nos jovens o risco relativo era de 1.29 (IC 95%: 1.14-1.46) para psoríase ligeira e de 3,10 (IC 95%: 1.98-4.86) para psoríase grave; acima dos 60 anos os valores eram de 1.08 (IC 95%: 1.03-1.13) e 1.36 (IC 95%: 1.13-1.64), respectivamente⁴³.

Desde então multiplicaram-se os estudos sobre esta associação, nem todos com resultados concordantes. Numa coorte de grande dimensão (48523 doentes), no Reino Unido, concluiu-se que a psoríase, mesmo que grave, não constituía factor de risco independente para doença CV⁴⁴. Globalmente, porém, a literatura aponta para uma associação inequívoca, sobretudo em doentes com psoríase grave, definida na maior parte dos artigos como doença tratada com fármacos sistémicos ou biotecnológicos.

Verificou-se que em jovens com psoríase grave o risco de EAM é 3 vezes superior ao da população saudável e que placas de aterosclerose nas coronárias ocorrem 2 vezes mais frequentemente em doentes com psoríase do que na população de controlo⁴⁵. O risco relativo de AVC, num estudo envolvendo 39558 doentes, realizado na Dinamarca, foi de 1.97 (IC 95%: 1.66-2.34) na psoríase ligeira e de 2.8 (IC 95%: 1.81-4.34) na grave, nos doentes com menos de 50 anos e ligeiramente menor nos doentes acima desta idade: 1.13 (IC 95%: 1.04-1.21) e 1.34 (IC 95%: 1.04-1.71), respectivamente⁴⁶.

O risco relativo de eventos CV graves (EM, AVC, mortalidade de causa CV) em doentes com psoríase grave num período de 10 anos foi estimado em 6.2%⁴⁷ e a inclusão do risco atribuível a psoríase no *Framingham risk score* conduziu a uma reclassificação do risco na maioria dos doentes, passando para uma categoria de risco superior, com implicações nas estratégias de prevenção⁴⁸. Em Portugal um estudo com 100 doentes mostrou que 28.6% dos doentes com psoríase tratados para HTA e 42.9% tratados para hipercolesterolemia, estavam efectivamente subtratados, quando reclassificados em relação ao *Framingham risk score*, tendo em consideração o risco atribuível à psoríase⁴⁹.

Uma meta-análise de 2013 que incluiu 14 estudos, entre revisões sistemáticas e estudos de coorte, refere um aumento de risco relativo de mortalidade cardiovascular (RR 1.37; IC 95%: 1.17-1.60), de enfarte agudo de miocárdio (RR 3.04; IC 95%: 0.65-14.35) e de acidente vascular cerebral (RR 1.59; IC 95%: 1.34-1.89) em doentes com psoríase grave, mas não com ligeira⁵⁰. Outra meta-análise com 9 estudos, englobando 201239 doentes com psoríase ligeira e 17415 doentes com psoríase grave, verificou que a psoríase ligeira está associada a aumento do risco de EAM (RR 1.29; IC 95%: 1.02-1.63) e AVC (RR 1.12; IC 95%: 1.08-1.16) enquanto a doença grave confere maior risco de EAM (RR 1.7; IC 95%: 1.32-2.18) e AVC (RR 1.56; IC 95%: 1.32-1.84) e também de mortalidade CV (RR 1.39; IC 95%: 1.11-1.74)⁵¹.

Refira-se que a literatura regista um aumento geral de mortalidade relacionado com o diagnóstico de psoríase grave, não apenas por mortalidade CV mas também por outras causas de morte. Num estudo de coorte que incluiu 3603 doentes com psoríase grave, o encurtamento médio da esperança de vida foi de 6 anos, para as causas analisadas: doença CV, doença renal e demência⁵².

Hipertensão arterial

Nos doentes com psoríase encontra-se uma prevalência aumentada de HTA. Vários estudos o têm mostrado e as meta-análises confirmam esta associação.

Uma meta-análise de 24 estudos, englobando 309469 doentes com psoríase, refere um OR de 1.58 (IC 95%: 1.2-1.86) e identifica uma associação independente entre psoríase e HTA, depois de ajustar a análise para factores confundidores, como idade, sexo, tabagismo e obesidade⁵³. Adicionalmente, a psoríase associa-se a uma maior dificuldade no controlo da HTA, sobretudo a psoríase grave, com OR 1.48 (IC 95%: 1.08-2.04), independentemente do IMC ou outros factores de risco⁵⁴.

Esta associação não está ainda bem explicada mas poderá estar relacionada com várias vias biológicas, nomeadamente a) estimulação do eixo renina-angiotensina, com aumento da expressão do gene da renina em pele lesada de doentes com psoríase grave, assim como maior actividade de renina plasmática levando a maior libertação de aldosterona, vasoconstrição e consequente hipertensão⁵⁵; b) aumento da expressão de endotelina 1 em queratinócitos e no endotélio vascular, com efeito vasoconstritor e hipertensor⁵⁶; c) efeito de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-17, capazes de induzir hipertensão e disfunção vascular^{57,58}.

Diabetes

A associação entre psoríase e diabetes tipo 2 foi reportada em vários estudos^{59,60}.

Uma meta-análise compreendendo 27 estudos sobre a associação entre psoríase e diabetes descreve 5 estudos que avaliaram a incidência e 22 estudos que avaliaram a prevalência de diabetes em doentes com psoríase. Quanto à incidência, refere um risco relativo de 1.27 (IC 95%: 1.16-1.40); nos 22 estudos que avaliaram a prevalência de diabetes em doentes com psoríase verificou-se

um OR 1.59 (IC 95%: 1.38-1.83)⁶¹. Adicionalmente, os doentes diabéticos com psoríase têm maior risco de complicações microvasculares e macrovasculares⁶².

Recentemente foi publicada uma análise da relação entre psoríase, obesidade e diabetes tipo 1, com ênfase nos mecanismos auto-imunes⁶³, sublinhando o papel de mediadores como IL-6, IL-18 e TGF- β como indutores de diferenciação Th17, assim como o papel de miRNA na expressão de TNF- α .

Obesidade

A associação entre psoríase e excesso de peso ($26 > \text{IMC} > 29$) ou obesidade ($\text{IMC} \geq 30$) está descrita nas duas direcções, i.e., os doentes com psoríase têm maior prevalência de obesidade⁶⁴ e os doentes obesos têm maior prevalência de psoríase⁶⁵, embora objecções metodológicas dificultem as conclusões neste estudo.

Uma meta-análise de 16 estudos, incluindo 2.1 milhões de participantes, dos quais 201831 doentes com psoríase, confirmou esta associação, com OR 1.46 (IC 95%: 1.17-1.82) na psoríase ligeira e OR 2.23 (IC 95%: 1.63-3.05) na psoríase grave⁶⁶.

Esta associação encontra-se também na infância, conforme foi demonstrado num estudo que envolveu 409 crianças com psoríase, em 9 países, em que o OR para obesidade ($\text{IMC} > \text{percentil } 95$) foi de 4.29 (IC 95%: 1.96-9.39), sendo maior na psoríase grave (OR 4.92; IC 95%: 2.20-10.99) do que na psoríase ligeira (OR 3.6; IC 95%: 1.56-8.30)⁶⁷.

Vários factores podem explicar esta associação, nomeadamente o ambiente inflamatório comum às duas patologias⁶⁸, com níveis aumentados de TNF- α , IL-6, M-CSF e MCP-1. Verifica-se em doentes com psoríase um aumento de adipocinas inflamatórias, e.g., leptina⁶⁹ e resistina e paralelamente uma diminuição de adiponectina que é uma adipocina com actividade anti-

inflamatória, capaz de induzir a expressão de IL-10 e de inibir a expressão de TNF- α , IL-6, IFN- γ e ICAM-1^{66,70}.

É importante a relação da obesidade com a gravidade da doença e a resposta à terapêutica. Em doentes obesos com psoríase está demonstrado um aumento de risco de nefrotoxicidade por ciclosporina⁷¹ assim como um aumento do risco de hepatotoxicidade por metotrexato⁷². Também a resposta às terapêuticas biotecnológicas é influenciada pela obesidade, verificando-se uma redução da eficácia, um aumento do custo e um aumento dos efeitos adversos em doentes obesos com psoríase^{68,73}.

Dislipidémia

Numerosos estudos referem que a psoríase está associada a alterações do perfil lipídico. Descreve-se aumento dos níveis de triglicéridos, colesterol total e LDL⁷⁴⁻⁷⁶. Com resultados algo divergentes, Neimann analisou uma base de dados da medicina geral do Reino Unido e encontrou 127706 doentes com psoríase ligeira e 3854 com psoríase grave, descrevendo nesta vasta população taxas de prevalência de hiperlipidémia de 4.7% e 6%, respectivamente⁷⁷; porém, neste estudo, os resultados perdiam significado quando ajustados para obesidade e diabetes que também se associam a alteração do perfil lipídico.

A associação independente com dislipidémia foi posteriormente confirmada por uma meta-análise que incluiu 75 estudos, englobando um total de 503686 doentes e 29686694 controlos⁷⁸.

Todavia, a literatura mostra resultados bastante divergentes no que respeita às alterações do perfil lipídico, havendo estudos que não encontram qualquer relação entre o perfil lipídico e a psoríase^{79,80}. Um estudo transversal da população efectuado nos EUA analisou dados de 13418 doentes com psoríase e concluiu não haver nessa amostra relação significativa entre psoríase e alterações lipídicas⁸¹.

Estas disparidades podem ser explicadas pelo facto de os estudos incluírem grupos heterogéneos, nomeadamente no que respeita a gravidade e duração da doença, assim como diferentes regimes terapêuticos que podem reconhecidamente alterar o perfil lipídico (e.g., acitretina ou ciclosporina).

Alguns autores sugerem que as alterações do perfil lipídico são precoces e portanto provavelmente seriam geneticamente determinadas^{82,83}, e não apenas induzidas pela psoríase ou pelas terapêuticas sistémicas efectuadas.

A importância desta interacção entre metabolismo lipídico, stress oxidativo e inflamação crónica deu origem à classificação da psoríase como doença imunometabólica⁸⁴.

Aterosclerose

É aceite que a aterosclerose é desencadeada por processos inflamatórios crónicos e está associada a doenças imunoinflamatórias crónicas sistémicas como o LES ou a artrite reumatóide⁸⁵.

O aumento da prevalência de calcificação nas artérias coronárias está descrito na psoríase⁸⁶ e na artrite psoriásica⁸⁷. Está também demonstrada uma maior rigidez arterial, relacionada com o estado inflamatório⁸⁸. Num estudo caso-controlo com 43 doentes com psoríase, concluiu-se que estes doentes têm maior disfunção endotelial e um aumento da espessura da íntima e média carotídeas⁸⁹. Numa meta-análise publicada em 2016, compreendendo um total de 20 estudos quantificando a espessura da íntima e média carotídea e a dilatação mediada por fluxo, os autores concluem que os doentes com psoríase têm um aumento significativo de espessura da íntima e média carotídeas com uma diferença média ponderada de 0.11mm (IC 95%: 0.08-0.15), e uma diminuição da dilatação mediada por fluxo com uma diferença média ponderada de -2.79% (IC 95%: -4.14% a -1.43%)⁹⁰.

As causas para esta associação não estão totalmente esclarecidas mas seguramente são determinantes os processos inflamatórios comuns, que estão subjacentes às duas patologias. Neste contexto salienta-se o papel dos linfócitos Th1 e Th17 na patogénese das placas de aterosclerose e de psoríase⁹¹, a activação de monócitos e neutrófilos, o aumento de micropartículas (vesículas da membrana celular de células endoteliais, plaquetas e monócitos/macrófagos, libertadas durante os processos de activação celular ou de apoptose) em circulação⁹², assim como a disfunção endotelial/angiogénese e o papel de factores de *stress* oxidativo também comuns⁹³. Uma revisão sistemática de 20 estudos, compreendendo 2261 doentes com psoríase ou artrite psoriásica, mostra um aumento significativo de rigidez arterial, perturbação de vasodilatação dependente do endotélio, aumento da espessura da íntima e média carotídeas e redução da elasticidade da aorta. Este estudo sugere também um possível efeito de melhoria da função endotelial após terapêutica com fármacos anti-TNF α .

Compreende-se, portanto que a psoríase seja um factor de risco para aterosclerose subclínica⁸⁹ e para doença CV, em consequência deste estado inflamatório/oxidativo sistémico crónico e da evolução paralela com aterosclerose.

Esta associação é tão relevante que a psoríase pode ser tomada como modelo humano para o estudo da aterogénese inflamatória, conforme foi sugerido numa publicação recente⁹⁴.

Uma das características típicas da psoríase é o infiltrado neutrofilico na epiderme, consequência da libertação de factores quimiotáticos para neutrófilos. Estas células vão libertar espécies reactivas de oxigénio (ROS) resultantes da activação de enzimas proteolíticos e de NADPH oxidase⁹⁵. Vários metabolitos são reveladores deste estado de *stress* oxidativo, nomeadamente a LDL oxidada (ox-LDL), um marcador de lipoperoxidação

que se encontra aumentado em doentes com psoríase grave em actividade⁹⁶ e cuja presença na epiderme de pele lesada foi demonstrada por imunofluorescência directa⁹⁷. A ox-LDL é também importante na patogénese da aterosclerose quer pelo *stress* oxidativo vascular quer pelo seu potencial inflamatório, activando a expressão de moléculas de adesão endoteliais. Está demonstrada a sua capacidade antigénica, levando ao desenvolvimento de anticorpos anti-ox-LDL (Ac-ox-LDL). O nível de Ac-ox-LDL pode ser um indicador de oxidação *in vivo* de LDL e tem sido apontada a sua importância na aterosclerose em geral e no enfarte de miocárdio em particular, em doentes com LES e artrite reumatóide e também na própria psoríase⁹⁸.

A ox-LDL forma complexos com a β 2-glicoproteína 1 (ox-LDL- β 2-GP1), os quais foram identificados em doentes com LES, SAF e nefrite crónica^{99,100}. A ligação de auto-anticorpos anti-ox-LDL- β 2-GP1 aos respectivos alvos produz complexos imunes que são rapidamente fagocitados por macrófagos, promovendo a formação de *foam-cells* e a consequente activação endotelial. O seu papel aterogénico foi sugerido por estudos em doentes com LES e com SAF^{101,102}.

Lipoproteínas de alta densidade

As lipoproteínas formam um sistema complexo de transporte de colesterol. Elas são compostas por lípidos e proteínas (apoproteínas) com diferentes dimensões e densidades. Genericamente contêm um núcleo central composto por colesterol esterificado e triglicéridos, rodeado por um revestimento anfipático, constituído por uma monocamada de fosfolípidos na qual se encontram embebidas moléculas de colesterol livre e apoproteínas. Desta forma, conseguem transportar no plasma lípidos hidrofóbicos. As lipoproteínas são classificadas com base na sua densidade, por ultracentrifugação, em 5 classes: quilomicrons, VLDL, IDL, LDL e HDL.

O primeiro estudo que demonstrou a importância das lipoproteínas como factor de risco CV foi o *Framingham Heart Study*; desde então, a investigação neste campo tem sido intensa. Salienta-se que, apesar de todo o trabalho de investigação, a caracterização das partículas de HDL e o seu metabolismo estão ainda pouco esclarecidos, ao contrário do que se passa com as LDL, de tal forma que um dos mais reputados investigadores desta área, Anatol Kontush, chama ao seu projecto “The mystery of HDL”.

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são produzidas pelo fígado e pelo intestino. Têm a mesma estrutura básica, com um núcleo central de colesterol esterificado e triglicéridos envolvido por uma camada de fosfolípidos e apoproteínas e vários tipos de proteínas. Porém, ao contrário das outras lipoproteínas, mais de metade da sua massa é composta por proteínas - Fig. 2.

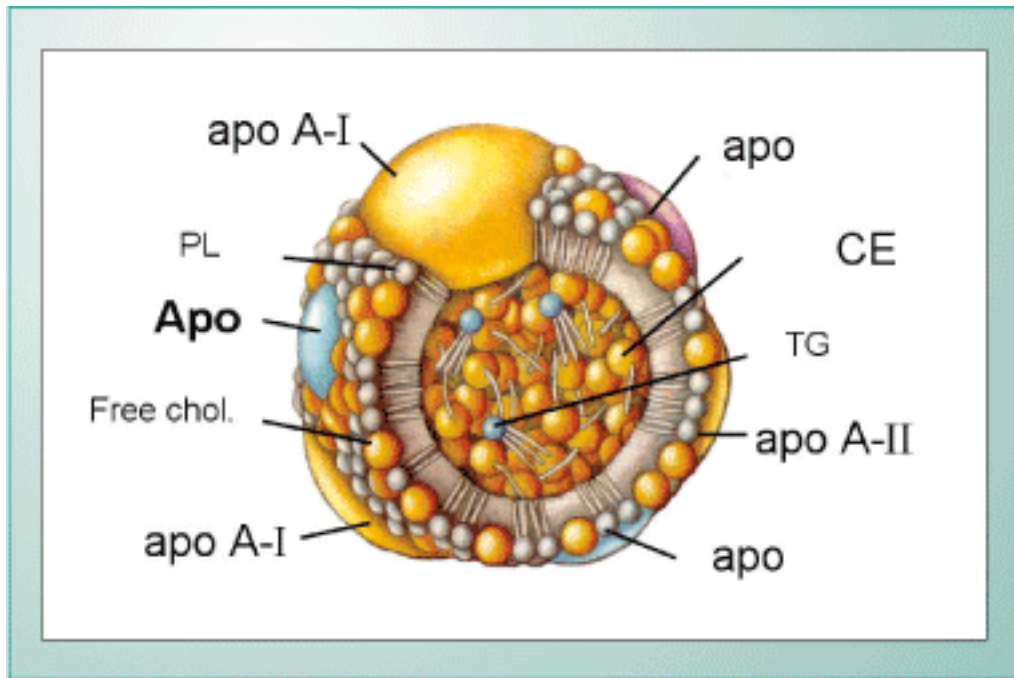


Figura 2 – Representação de partícula esférica de HDL (Reproduzido de Forti et al 2006¹⁰³ Creative Commons Attribution-Noncommercial License)

As HDL são um grupo extremamente heterogêneo e complexo para o qual várias classificações têm sido propostas. Todavia, diferentes métodos de separação conduzem a diferentes classificações que não são totalmente sobreponíveis entre si pois não existe correlação directa entre as partículas isoladas com duas técnicas diferentes (Fig. 3)¹⁰⁴.

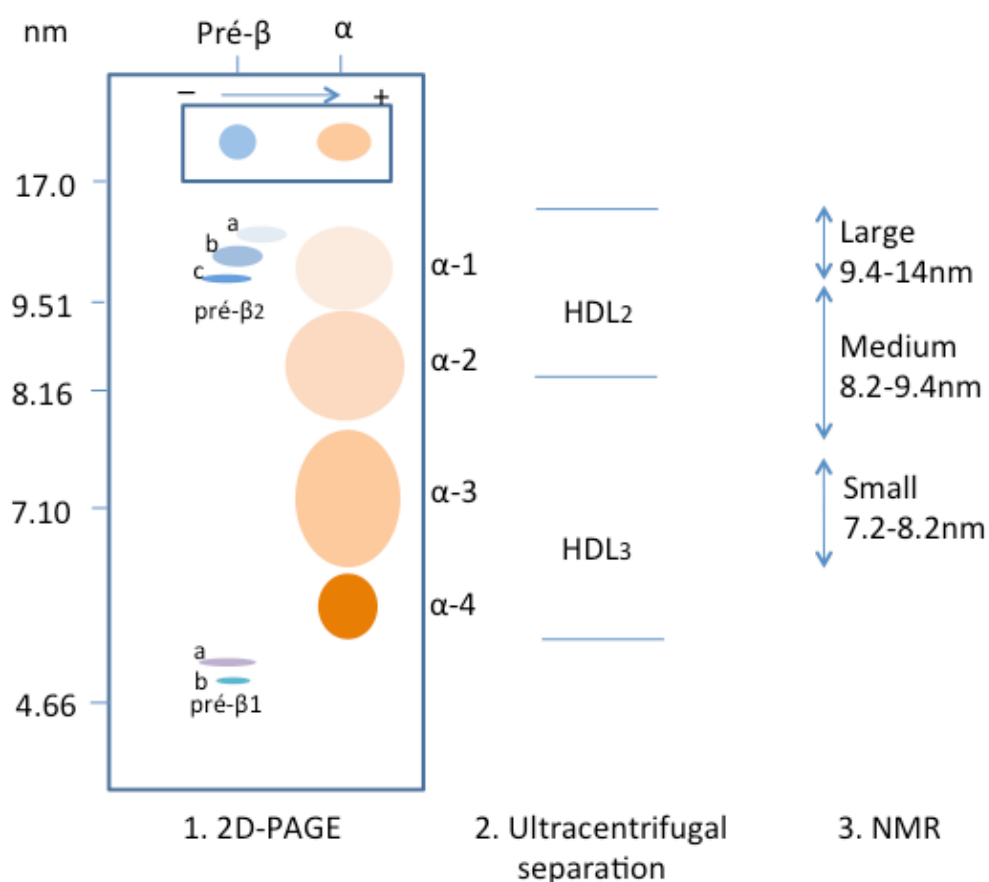


Figura 3 - Comparação esquemática da nomenclatura de subclasses de HDL contendo Apo A-I separadas por diferentes processos.

1. 2D-PAGE - o plasma foi submetido a uma electroforese em gel de agarose/poliacrilamida bidimensional (massa:carga) e utilizaram-se anticorpos para visualizar as proteínas individualizadas. No gel estão indicados os marcadores moleculares. 2. Separação por ultracentrifugação. 3. Ressonância magnética nuclear (Adaptado de Hafiane et al, 2015¹⁰⁵ Creative Commons Attribution-Noncommercial License)

Habitualmente descrevem-se as HDL discóides ou nascentes, pobres em colesterol, compostas por 2 cadeias de apoproteína A-I (ApoA-I) e fosfolípidos, em contraste com as HDL esféricas, maduras, contendo mais apoproteínas e um núcleo lipídico muito maior. A ultracentrifugação por gradiente de densidade ou isopícnica permite separar as HDL esféricas em HDL₂ e HDL₃, sendo as HDL₂ as que têm maior dimensão e maior conteúdo

lipídico; correspondem às α -1 na electroforese e são as que mais aumentam sob terapêutica com estatinas¹⁰⁴.

As principais apoproteínas presentes nas HDL são a ApoA-I e ApoA-II, sendo que a ApoA-I representa cerca de 70% do conteúdo proteico das HDL e a ApoA-II cerca de 15-20%. A estrutura e função das diferentes subclasses de HDL depende sobretudo da natureza extremamente dinâmica da molécula de ApoA-I, capaz de rapidamente modificar a sua conformação, consoante as condições do meio^{106,107}. As partículas de HDL podem conter várias outras apoproteínas nomeadamente a apoD, pertencente à família das lipocalinas e envolvida no transporte transmembranar de pequenas partículas hidrofóbicas; a apoE, muito importante porque é o ligando para vários receptores de lipoproteínas, mediando assim a sua internalização e o seu catabolismo (não só das HDL mas também das LDL e VLDL); a apo F, que existe nas HDL e nas LDL e é inibidora da CETP, também chamada “*lipid transfer inhibitor protein*”; e a apoM, também da família das lipocalinas, que funciona como ligando para o retinol e o ácido retinóico.

As HDL são responsáveis pela remoção de colesterol dos tecidos periféricos e de outras lipoproteínas e pelo seu transporte para o fígado (transporte reverso do colesterol). Este processo, dependente sobretudo da ligação da ApoA-I aos transportadores ABCA1 (partículas discóides) e ABCG1 (partículas esféricas), tem uma enorme importância biológica e constitui um dos principais mecanismos de proteção de doença cardiovascular¹⁰⁸.

O colesterol assim removido das células dos tecidos periféricos e de macrófagos é esterificado pela LCAT (lecithin cholesterol acyltransferase) e armazenado no centro hidrofóbico das partículas de HDL que se tornam partículas esféricas, maduras, de maior dimensão. Estas podem transferir o colesterol directamente para hepatocitos, via SB-R1, ou para lipoproteínas contendo ApoB (LDL, VLDL), via CETP (*cholesterol ester transfer protein*), por troca com os triglicéridos¹⁰⁹ (Fig. 4)

Tabela 1. Principais funções ateroprotectoras das HDL

Funções das HDL	
Transporte reverso de colesterol	Remoção de colesterol dos tecidos, esterificação e transporte para o fígado
Efluxo de colesterol	Remoção de colesterol e fosfolípidos de macrófagos Interação com receptores celulares: ABCA1, ABCG1, SR-BI
Actividade anti-inflamatória	Inibição da expressão de VCAM-1 em células endoteliais Remoção de lípidos oxidados pró-inflamatórios de células e lipoproteínas
Actividade anti-oxidante	Inibição da oxidação de LDL Remoção de lípidos oxidados de células e de ox-LDL Combate ao stress oxidativo
Actividade citoprotectora	Inibição da apoptose de células endoteliais Efluxo de oxiesteróis tóxicos
Actividade vasodiladora	Indução da produção de NO Inibição da libertação de superóxido
Actividade antitrombótica	Inibição da agregação plaquetária Activação de eNOS
Actividade anti-infecciosa	Interação com LPS

HDL: lipoproteínas de alta densidade, ABCA1: *ATP-binding cassette transporter A1*, ABCG1: *ATP-binding cassette transporter G1*, SR-BI: *scavenger receptor class B type I*, VCAM-1: Molécula de adesão de célula vascular 1, LDL: lipoproteínas de baixa densidade, ox-LDL: LDL oxidada, ROS: espécies reactivas de oxigénio, NO: óxido nítrico, eNOS: *endothelial nitric oxide synthase*; LPS: lipopolissacárido.

Actividade anti-inflamatória

A capacidade anti-inflamatória das HDL é multifacetada e é verificável de várias formas, quer *in vitro* quer *in vivo*. Estas partículas desempenham funções importantes de regulação dos processos inflamatórios, funcionando como uma plataforma de integração da imunidade inata e adaptativa¹¹². A variação do conteúdo e disponibilidade de colesterol nas *lipid rafts* das membranas celulares, resulta em modulação de TLRs, MHC-II e receptores de células B e T e a transferência de S1P contribui para a migração de células imunes.

As HDL são capazes de inibir a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina em células endoteliais estimuladas por TNF- α , IL-1, endotoxina ou PCR, através da inibição do factor de transcrição nuclear NF- κ B. Outro efeito da inibição de NF- κ B é a inibição da produção de superóxido endotelial e alteração da biodisponibilidade de NO. Os efeitos anti-inflamatórios endoteliais das HDL são mediados via SR-BI, PDZK1, PI₃K, eNOS e S1P¹¹³.

As partículas de HDL são ainda capazes de reduzir a expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas na superfície de monócitos, inibindo assim a sua activação^{114,115}.

As actividades anti-inflamatórias das HDL dependem sobretudo das ApoA-I e ApoE e de fosfolípidos, nomeadamente da fosfatidilcolina¹¹⁶.

Actividade anti-oxidante

As espécies reactivas de oxigénio podem causar danos celulares graves a vários níveis, modificando a estrutura e função de lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Uma das mais importantes funções das HDL é a desoxidação das LDL oxidadas, cuja fagocitose por monócitos conduz à formação de *foam cells*. A ox-LDL é também indutora da expressão endotelial de moléculas inflamatórias e é ainda indutora de apoptose de células endoteliais.

O papel anti-oxidativo das HDL depende sobretudo das apoproteínas ApoA-I e ApoE mas também de outras apoproteínas (ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V, ApoJ, ApoM) e de enzimas, nomeadamente a PON₁, LCAT e PAF-AH, que são coadjuvantes neste processo. Os lípidos oxidados podem ser transferidos directamente das oxLDL ou das células da parede arterial para as HDL, onde são inactivados. Um dos mais importantes mecanismos de inactivação consiste na transferência de átomos de oxigénio dos fosfolípidos oxidados para os resíduos Met da ApoA-I, reduzindo assim os hidroperóxidos (PLOOH) para os correspondentes hidróxidos inactivos (PLOH). Outro mecanismo depende da acção enzimática da PON, LCAT e PAF-AH, que catalisam a hidrólise de fosfolípidos oxidados em lisofosfatidilcolina. A eficácia destes mecanismos anti-oxidativos depende da capacidade de transferência de lípidos oxidados para as partículas de HDL e esta depende da fluidez da superfície lipídica das HDL, sendo que quando diminui a fluidez da superfície (o que corresponde a maior rigidez das partículas) diminui a capacidade de transferência de lípidos oxidados. Isto acontece, por exemplo, quando aumenta a relação esfingomielina/fosfatidilcolina ou a percentagem de ácidos gordos saturados na monocamada de superfície das HDL.

As partículas de HDL são também capazes de inibir a produção de ROS pelos macrófagos, através da sua ligação aos receptores ABCG₁, promovendo o efluxo de esteróis oxidados, como 7-cetosterol.

Todas estas vias biológicas contribuem para suspender o processo de lipoperoxidação em cadeia, um ciclo vicioso de oxidação sucessiva de lípidos e fosfolípidos.

Outras funções ateroprotectoras das HDL

Demonstram-se várias outras funções ateroprotectoras das HDL, nomeadamente anti-proliferativas, anti-plaquetárias e indutoras de NO.

A inibição da transmigração de monócitos depende da actividade da PON₁ e da PAF-AH e encontra-se inibida em estados inflamatórios, dado que durante uma resposta de fase aguda se verifica acumulação de SAA nas partículas de HDL, por troca com apoA-I¹¹⁷. Em consequência, durante estados inflamatórios ou infecciosos agudos, perde-se esta actividade anti-inflamatória.

A estimulação de eNOS resulta, entre outros mecanismos, da ligação de HDL ao receptor SR-BI das *caveolae* das membranas de células endoteliais. Este processo conduz a vasodilatação, para a qual concorre a estimulação da produção de PGI₂, via aumento da expressão de COX-2. Um efeito estimulador de células progenitoras endoteliais foi demonstrado quer para ApoA-I quer para ApoE, promovendo a regeneração de endotélio lesado¹¹⁸. Estas acções das HDL são, portanto, protectoras da função endotelial.

As plaquetas desempenham vários papéis na indução, progressão e ruptura das placas de ateroma, nomeadamente activação endotelial, secreção de factores de crescimento, recrutamento de células inflamatórias, conversão de monócitos em *foam cells* e na formação de trombos arteriais¹¹⁹. A actividade anti-plaquetária das HDL parece estar dependente sobretudo da ligação de HDL₃ a receptores SR-BI plaquetários¹²⁰. As HDL inibem também vários factores de coagulação e estimulam a produção de NO.

O efeito anti-apoptótico parece estar directamente relacionado com a capacidade anti-oxidativa e redução de ROS intracelulares, produção de NO via SR-BI e preservação de integridade mitocondrial¹²¹.

ApoA e ApoE

A ApoA-I é a mais importante das apoproteínas das HDL e é a mais estudada e mais referida na literatura. A maior parte das actividades protectoras atrás descritas é dependente sobretudo de ApoA-I, embora a presença de outras

apoproteínas e fosfolípidos contribua para a modulação destas acções. É a ApoA-I que se liga aos transportadores ABCA₁, ABCG₁ e SR-BI e é também a ApoA-I que reduz produtos de oxidação, como a ox-LDL. A transferência de fosfolípidos oxidados das LDL para as HDL₃ depende não só da ApoA-I mas também da rigidez das partículas de HDL₃, sendo tanto maior a transferência quanto menor a rigidez¹²².

A ApoE tem merecido crescente atenção pois vários estudos reportam o seu papel anti-aterogénico, independente do transporte de lípidos, com acções anti-oxidantes, anti-proliferativas (para linfócitos e células musculares lisas), anti-inflamatórias, anti-agregantes e indutoras de NO¹²³. A ApoE reduz a acumulação de lípidos em monócitos circulantes e diminui os processos inflamatórios em monócitos e no endotélio vascular¹²⁴.

Mais recentemente demonstrou-se também que a ApoE suprime a inflamação mediada por NF- κ B em monócitos e macrófagos, com consequente inibição do processo aterosclerótico¹²⁵.

Salienta-se que a interação entre os diversos componentes das partículas de HDL é importante e indispensável para manter a sua funcionalidade, verificando-se, por exemplo, que algumas funções classicamente atribuídas à ApoA só ocorrem na presença de ApoE¹²⁶. Esta é a única apoproteína que, além de ser produzida no fígado e intestino, é produzida também no baço, testículos, astrocitos, macrófagos e queratinócitos¹²⁷.

Lipoproteínas de alta densidade disfuncionais

Várias patologias estão associadas a alterações estruturais e funcionais das HDL.

A investigação do proteoma tem revelado que a composição proteica das partículas de HDL é surpreendentemente complexa e heterogénea, estando actualmente descritas cerca de 100 proteínas que podem ser encontradas em

diferentes classes de HDL. É de notar que dentro da mesma classe a heterogeneidade é também elevada pois cada partícula tem uma determinada dimensão e peso molecular, não compatíveis com um conteúdo ilimitado de proteínas. As partículas de HDL têm uma notável capacidade de modificação pelo meio e podem rapidamente alterar não só a conformação espacial das apoproteínas, alterando as suas propriedades químicas e a sua polaridade, mas também alterar o seu conteúdo proteico. Estas modificações estruturais conduzem a alterações funcionais significativas. O doseamento de colesterol ligado às HDL (HDL-C) que se realiza por rotina na prática clínica é apenas indicador da quantidade de HDL na circulação, porém não tem a correlação que se esperaria com o risco cardiovascular precisamente porque essas partículas podem existir em número adequado mas não conseguir cumprir as suas funções cardioprotectoras.

Destas observações nasceu o conceito de HDL disfuncional. Neste contexto, o estudo do proteoma poderá dar origem a marcadores de risco cardiovascular mais fidedignos do que o doseamento simples de HDL-C¹²⁸.

Estados inflamatórios crónicos conduzem a alterações do proteoma, com acumulação de SAA e complemento (C₃), perda de funções enzimáticas, redução do número de moléculas de ApoA-I ou sua alteração estrutural por oxidação, glicosilação não enzimática (diabetes) ou fragmentação. No seu conjunto, estas alterações resultam na perda da capacidade anti-oxidante das HDL.

Recentemente tem-se atribuído uma importância crescente às alterações do lipidoma pois as alterações da função das HDL podem estar relacionadas com o conteúdo lipídico quer da camada de revestimento das partículas quer do núcleo neutro. Verifica-se que a capacidade das HDL₃ de protegerem as LDL de oxidação é inversamente proporcional à rigidez das HDL₃; esta por sua vez é directamente proporcional à relação esfingomielina/fosfatidilcolina, à relação de colesterol livre para fosfolípidos e à relação de ácidos gordos saturados para poli-insaturados. Outro factor é o conteúdo do núcleo central

de lípidos neutros, sendo que o aumento da proporção de triglicéridos para ésteres de colesterol altera a conformação da ApoA-I, tornando os resíduos de metionina menos acessíveis aos LOOH¹²². Conclui-se, portanto, que as alterações do lipidoma também influenciam a capacidade funcional das HDL.

Psoríase e lipoproteínas de alta densidade

A psoríase está associada a várias alterações das HDL que conduzem à perturbação da sua funcionalidade, resultando em perda de capacidade anti-oxidante e anti-inflamatória.

Mehta et al. descreveram em 112 doentes com psoríase um perfil lipoproteico aterogénico, comparável ao que se encontra na diabetes, com uma diminuição do efluxo de colesterol associado às HDL, um aumento das partículas LDL e uma redução do seu diâmetro, avaliado por RMN¹²⁹.

Um estudo do proteoma e do lipidoma em 15 doentes com psoríase revelou uma diminuição de ApoA-I e Apo-M e um aumento de ApoA-II e das proteínas de fase aguda como o SAA, a protrombina, a α -1-glicoproteína 1 e a α -1-antitripsina, associada a uma redução de fosfolípidos e colesterol. Nestes doentes havia ainda uma redução da capacidade de efluxo de colesterol, correlacionada com perda de ApoA-I, fosfatidilcolina e esfingomielina. Neste estudo não se observou alteração da actividade da PON¹³⁰.

Na população pediátrica, foi realizado um estudo em 44 doentes, encontrando-se também uma diminuição da capacidade de efluxo de colesterol quando comparado com controlos da mesma idade, concluindo os autores que, na psoríase, a perturbação do metabolismo lipídico tem um início precoce, ainda com níveis baixos de inflamação crónica¹³¹.

Uma investigação destinada a avaliar a actividade biológica das lipoproteínas plasmáticas em 25 doentes com psoríase e 25 controlos, revelou redução dos níveis plasmáticos de HDL e diminuição da actividade da PON₁, directamente correlacionada com a gravidade da psoríase, medida por PASI. Revelou também perturbações funcionais das HDL, nomeadamente na protecção contra a oxidação das LDL, na inibição da adesão de monócitos a células endoteliais induzida por TNF- α , na protecção contra a migração de monócitos induzida por ox-LDL e na protecção contra a apoptose de células endoteliais

induzida por TNF- α . Em conclusão, há diminuição das propriedades anti-oxidantes e anti-inflamatórias das HDL em doentes com psoríase¹³².

Os resultados quanto à actividade da PON₁ são divergentes. Encontram-se na literatura estudos que referem diminuição da actividade desta enzima, como os publicados por Usta et al, numa coorte de 25 doentes¹³³, ou Ferreti et al, em 23 doentes¹³⁴. Pelo contrário, há estudos que referem uma actividade aumentada⁸⁰ ou não alterada da PON¹³⁰. Um estudo de caso-controlo que incluiu 100 doentes com psoríase reportou a associação entre o alelo PON₁ 55M e a perturbação da capacidade anti-oxidante e do metabolismo lipídico¹³⁵. A tabela 2 resume os principais estudos publicados sobre as alterações das HDL associadas à psoríase.

É extremamente interessante verificar que a terapêutica da psoríase, sistémica e biotecnológica é capaz de reverter estas alterações^{136,137}. Está também descrita a melhoria da disfunção miocárdica em doentes com psoríase grave sob terapêutica com anti-TNF- α ¹³⁸. No seu conjunto, estes dados sugerem que a terapêutica da psoríase, em particular com agentes biotecnológicos, pode melhorar o risco cardiovascular dos doentes com psoríase

Tabela 2. Principais alterações de HDL associadas a psoríase

Referência: número de doentes estudados	Alterações de HDL
Mehta (36): 112 doentes	Diminuição do efluxo de colesterol
Holzer (32): 15 doentes	Diminuição do efluxo de colesterol
	Diminuição de apoA-I, apoA-II, apoM
	Diminuição de fosfolípidos (fosfatidilcolina e esfingomielina) e de colesterol
	Aumento de SAA, protrombina, α -1-anti-tripsina, α -1-glicoproteína ácida 1
	Sem alteração de actividade da PON ₁

Holzer (42): 15 doentes	<p>Diminuição do efluxo de colesterol</p> <p>Diminuição de apoA-I, apoM</p> <p>Diminuição de fosfolípidos (fosfatidilcolina e esfingomielina) e de colesterol</p> <p>Aumento de SAA, protrombina, α-1-anti-tripsina, α-1-glicoproteína 1</p> <p>Diminuição de actividade da PON₁</p>
He (38): 25 doentes	<p>Diminuição de actividade da PON₁</p> <p>Diminuição de actividade anti-inflamatória</p>
Usta (39): 25 doentes	Diminuição de actividade da PON ₁
Ferreti (40): 23 doentes	Diminuição de actividade da PON ₁
Toker (20): 30 doentes	Diminuição de actividade da PON ₁
Tom (37): 44 doentes pediátricos	Diminuição do efluxo de colesterol

HDL: lipoproteínas de alta densidade; apoA-I: apoproteína A-I; apoA-II: apoproteína A-II; apoM: apoproteína M; SAA: amiloide sérico A; PON₁: paraoxonase 1

Auto-anticorpos e aterosclerose

O actual paradigma de entendimento da aterosclerose transferiu o fulcro da sua patogénese, da acumulação de lípidos na íntima arterial para a activação e manutenção de processos inflamatórios endoteliais, celulares e humorais. Neste contexto, descreve-se a presença de linfócitos T e de vários auto-anticorpos em placas de ateroma¹³⁹. Em doentes com patologias auto-imunes, como o LES ou artrite reumatóide, é conhecido o risco aumentado de doença CV, independente dos factores de risco tradicionais. Paralelamente, em doentes com patologia CV mas sem doenças auto-imunes, níveis de auto-anticorpos contra ox-LDL, proteína de choque térmico (HSP) e cardiolipinas são predictores independentes de eventos cardiovasculares¹⁴⁰. Estes auto-anticorpos podem ser formados devido a reacções cruzadas entre antigénios microbianos e epitopos do *self*, como as ox-LDL ou HSP ou podem ser dirigidos contra proteínas do *self*, modificadas por processos oxidativos ou expostas por perturbação dos processos de apoptose e *clearance* celular¹⁴¹.

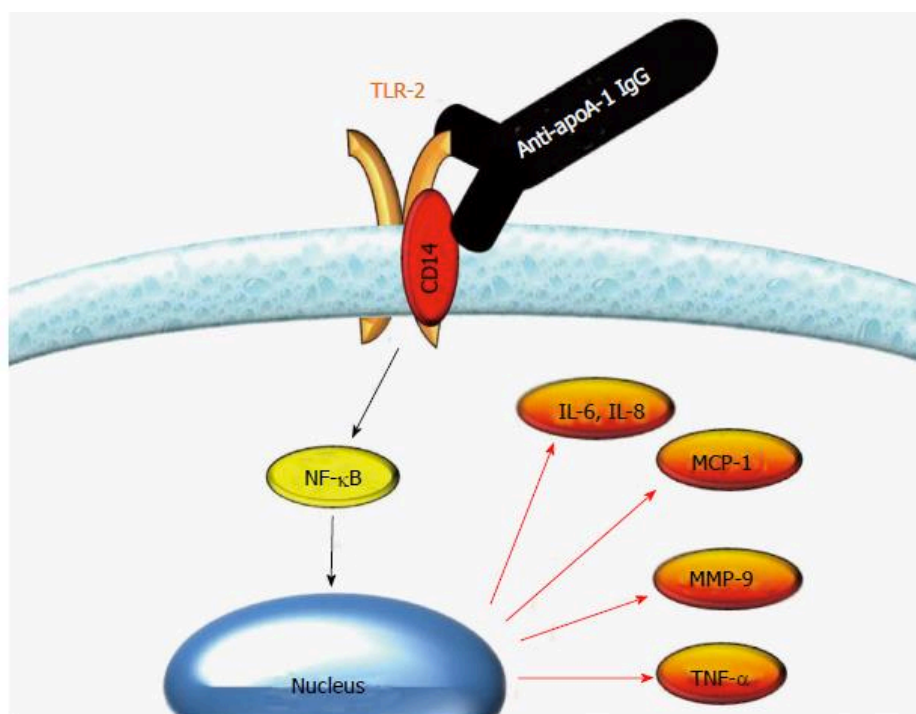
Os auto-antigénios que têm sido implicados na patologia cardiovascular são a ox-LDL, β -2-glicoproteína 1, HSP, hemoglobina oxidada¹⁴¹ e ainda a HDL e ApoA-I.

Os anticorpos anti-HDL (aHDL) começaram a ser caracterizados no contexto de doenças auto-imunes, como o LES e SAF. Sucessivas investigações demonstraram a associação entre aHDL e anticorpos anti-ApoA-I (aApoA-I) e a redução da actividade da PON₁, aumento de marcadores de disfunção endotelial (NO, V-CAM-1 e I-CAM) e redução da capacidade anti-oxidante total¹⁴²⁻¹⁴⁴. Mais tarde, demonstrou-se também a presença de aHDL com capacidade para bloquear as propriedades anti-aterogénicas das HDL em doentes com diabetes tipo 2¹⁴⁵.

O papel fundamental da ApoA-I na génese e funcionalidade das HDL está em consonância com a relevância dos aApoA-I demonstrada na literatura. É de notar que, nas placas de ateroma, a maior parte das moléculas de ApoA-I

encontra-se na íntima arterial, não ligada a partículas de HDL. Além das doenças auto-imunes, estes anticorpos aApoA-I estão também aumentados em doentes com patologia cardiovascular mas sem doença auto-imune. Está demonstrada a sua actividade inflamatória em estudos *in vitro* que relatam o aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8, metalopeptidase de matriz 9 (MMP-9), IL-6, TNF- α e MCP-1 (CCL2) em macrófagos derivados de monócitos humanos, num processo mediado pela ligação de aApoA-I ao complexo TLR2/CD14¹⁴⁶. Em estudos *in vivo*, em ratinhos ApoE^{-/-} (propensos a desenvolver aterosclerose), a imunização passiva com IgG aApoA-I conduz a aumento da dimensão das placas ateromatosas e também a maior instabilidade dessas placas, assim como a um aumento de necrose do miocárdio e aumento da taxa de mortalidade; este processo é mediado pela ligação de aApoA-I aos TLR2 e TLR4¹⁴⁷ (Fig.5).

Figura 5 - Actividade inflamatória de IgG anti-apoproteína A-I mediada por ligação ao complexo TLR2/CD14



Auto-anticorpos anti-apoproteína A-I desencadeiam uma resposta inflamatória por ligação ao complexo TLR 2/CD14 em macrófagos humanos, induzindo produção de citocinas pro-inflamatórias mediada por activação da via NF- κ B¹⁴⁸ (Reproduzido de Vuilleumier et al¹⁴⁸ Creative Commons Attribution-Noncommercial License)

Em humanos, foram ainda detectados níveis elevados de aApoA-I em várias doenças associadas a aumento do risco cardiovascular, e o nível de aApoA-I constitui um factor de prognóstico independente de pior evolução em doentes com EAM e estenose carotídea e de calcificação coronária em indivíduos obesos^{148,149}.

Numa revisão recente, Chistiakov salienta o valor prognóstico dos aApoA-I em várias patologias cardiovasculares, como o enfarte agudo do miocárdio, síndrome coronário agudo e estenose carotídea grave¹⁵⁰. Também na diabetes tipo 2 se considera que os aApoA-I são marcadores de risco cardiovascular¹⁵¹.

O papel dos anticorpos aApoA-I como biomarcadores de risco CV é fundamentado pela sua associação com eventos CV independentemente dos factores de risco tradicionais, por aumentarem a capacidade preditiva em relação aos actuais critérios de estratificação de risco CV, pela sua estabilidade e longa semi-vida, que lhes confere melhor poder de prognóstico a longo prazo em comparação com marcadores com menor semi-vida, e finalmente por serem doseáveis de forma simples, rigorosa e pouco onerosa¹⁴⁸.

Objectivos da tese

O objectivo desta tese é verificar a hipótese de poder existir na psoríase um nível elevado de aHDL, assim como procurar caracterizar esses anticorpos e suas eventuais correlações com características clínicas ou laboratoriais da população estudada e também avaliar a sua actividade biológica.

Objectivos específicos

- Recrutar uma coorte de doentes com psoríase e um grupo de controlo constituído por indivíduos saudáveis e caracterizar os dois grupos quanto a parâmetros demográficos, clínicos e bioquímicos.
- Quantificar os anticorpos aHDL, aApoA-I, aApoE e aPON₁ nos dois grupos.
- Quantificar indicadores de inflamação: PCR, TNF- α , IL6, VCAM-1.
- Quantificar marcadores de oxidação: metabolitos de óxido nítrico.
- Correlacionar os níveis dos anticorpos com os diversos parâmetros clínicos e analíticos.
- Avaliar a actividade funcional dos aHDL.

Métodos

População

Foram recrutados 67 doentes consecutivos, seguidos na consulta externa de Dermatologia do Hospital dos Capuchos – Centro Hospitalar de Lisboa Central (CHLC).

Os critérios de inclusão foram: diagnóstico clínico de psoríase vulgar, cumprimento das consultas de *follow-up* e dos meios auxiliares de diagnóstico propostos e idade superior a 18 anos. Foram critérios de exclusão a presença de disfunção renal ou hepática (creatinina sérica > 1.2 mg/dL e ALT/AST > 2x valor de referência), doença infecciosa e neoplasia maligna. No mesmo período foi recrutado o grupo de controlo, constituído por 50 dadores de sangue do CHLC.

Registaram-se os dados clínicos de todos os participantes, incluindo comorbilidades, terapêuticas efectuadas e, no grupo com psoríase, a escala de avaliação da gravidade da doença (PASI: *Psoriasis Area and Severity Index*). Estes dados encontram-se reunidos na tabela 3. Para a análise estatística, considerou-se psoríase grave a doença com PASI>10, antes da introdução de terapêutica sistémica ou biotecnológica.

Os doentes foram convidados a participar no estudo, sendo-lhes fornecida pelo médico toda a informação necessária, em linguagem acessível e com suporte escrito. Foi obtido consentimento esclarecido e foi informada a possibilidade de retirar o consentimento em qualquer momento.

Este estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética do CHLC e da NMS/FCM e pela Comissão Nacional de Protecção de dados. Foram seguidas as normas aprovadas pela convenção de Helsínquia.

Métodos bioquímicos

Foram colhidas amostras de sangue após jejum de 12 horas. As amostras foram centrifugadas a 3000g, a 4°C durante 10 minutos, para separar o soro. Os soros foram armazenados em arca a -80°C até serem analisados.

Os valores de colesterol total, HDL-C e LDL-C e triglicéridos foram determinados por método colorimétrico padrão de reacção enzimática (kits comerciais Randox, Irladox - Porto, Portugal). As análises das restantes variáveis biológicas (glicemia, hemoglobina A_{1c}, creatinina, transaminases) foram realizadas no laboratório do hospital, no contexto da avaliação laboratorial periódica da consulta externa.

Actividade de paraoxonase 1 (PON1)

A actividade de PON1 foi determinada pelo método descrito por Eckersson et al⁵² com modificações. Resumidamente, o substrato paraoxon (1.0mM) (D9286, Sigma-Aldrich) foi preparado em 290µl de tampão glicina 50mM contendo 1mM CaCl (pH 10.5) e depois incubado a 37°C com 10µl de soro, 10 min, em placas de 96 poços (Polysorp). Monitorizou-se a formação de para-nitrofenol, a 412nm, e a actividade foi expressa em µmol p-nitrofenol por ml soro por minuto. A actividade enzimática foi expressa em U/L, definidas como 1µmol de p-nitrofenol produzido por minuto e por litro, nas condições do ensaio. Todas as amostras foram testadas em triplicado e os coeficientes de variação inter e intra placa foram inferiores a 10%.

Doseamento de metabolitos do óxido nítrico

Os metabolitos do óxido nítrico, nitrito (NO₂) e nitrato (NO₃) foram determinados como medida indirecta da produção de óxido nítrico, uma vez

que este tem uma semi-vida muito curta, pelo que não se consegue medição directa com suficiente rigor¹⁵³.

Utilizou-se a reacção de Griess modificada: o soro foi diluído a 1:4 em tampão fosfato (PBS), pH 7.4, ultra-filtrado por centrifugação a 10000g durante 1h, usando filtros de 10000 KD (Ultrafree-MC, Millipore, VWR) e colocado em placas de 96 poços. A cada poço foi adicionado 50µl de amostra ou de controlo, em duplicado. Em metade da placa adicionou-se 4µl de nitrato redutase (Sigma-Aldrich) (determinação de nitritos) e na outra metade 10µl de NADPH (Sigma-Aldrich) (determinação de nitratos), obtendo-se uma concentração final de 6.3U/L e 550µM, respectivamente. Seguiu-se incubação a temperatura ambiente, durante 2h, após o que se iniciou a reacção de Griess, adicionando sulfanilamida a 2% (Sigma-Aldrich) em H₃PO₄ a 5% e dihidrocloreto de N (1 Naftil) – etilenodiamida (NED) a 0.2% (Sigma-Aldrich), em água, misturando antes da utilização. Após 10 minutos de incubação efectuou-se a leitura a 540 nm.

Métodos imunológicos

Enzyme-linked Immunoabsorbant Assays (ELISA)

Os ensaios realizados por ELISA foram desenvolvidos e optimizados no nosso laboratório, em relação a parâmetros como o tipo de placas a utilizar, as concentrações dos reagentes e soros, a duração dos períodos de incubação, as temperaturas, os tampões e soluções de bloqueio e a detecção de sinal.

Anticorpos IgG e IgM anti-HDL (aHDL)

Utilizaram-se placas de 96 poços (Polysorp, Nunc, VWR, Portugal) revestindo metade da placa com HDL humana, 20µg/mL (IgG) ou 10µg/mL (IgM) (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) em etanol a 70%, até evaporação a 37°C.

Depois as placas foram bloqueadas pela adição de albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich), 100µL/poço, a 1% ou a 2% (w/v), respectivamente, em 10mM PBS (Sigma-Aldrich), com pH 7.4, durante 1 h, a 37°C. O reagente não ligado foi removido por lavagens sucessivas com PBS. Seguidamente diluíram-se as amostras de soro, assim como controlos positivos e controlos negativos, a 1:100 no respectivo soluto de bloqueio e colocaram-se nos poços das placas, onde incubaram 1h a 37°C. Os anticorpos não ligados foram removidos por lavagem com PBS. Anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) anti IgG e IgM humanas, com concentrações de 1:1000 e 1:1500 respectivamente, foram adicionados, incubando 1h a 37°C. Seguiram-se 3 lavagens com PBS e 3 com tampão bicarbonato (BIC), pH 9.8, e depois fez-se a reacção colorimétrica, com 100µL/poço de p-nitrofenil fosfato (pNPP, Sigma-Aldrich) 1:5000 em tampão BIC, durante 1h a 37°C. A cor amarelada resultante da reacção da fosfatase alcalina com o seu substrato foi lida a 405nm, num aparelho Biotrak II plate reader (Amersham Biosciences).

Os resultados foram registados como percentagem do controlo positivo de cada placa, após subtração do valor da metade não revestida da placa.

Os ensaios foram efectuados em triplicado e os coeficientes de variação inter e intra placa foram inferiores a 10%.

Anticorpos IgG anti ApoA-I (αApoA-I) e anti ApoE (αApoE)

Utilizaram-se placas de 96 poços (Polysorp, Nunc, VWR, Portugal) revestindo metade da placa com ApoA-I ou ApoE humana, 10µg/mL (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) em etanol a 70%, até evaporação a 37°C. As placas foram bloqueadas, por ligação não específica, com BSA a 1% em PBS, pH 7.4, colocando 100µL/poço, durante 1h a 37°C. Efectuaram-se 4 lavagens com PBS e colocaram-se as amostras de soro e os controlos positivos e negativos, diluídos a 1: 200 na solução de bloqueio, durante 1h a 37°C. Repetiu-se a lavagem e colocou-se o anticorpo secundário anti-IgG humana, conjugado

com fosfatase alcalina, diluído a 1:1000 na solução de bloqueio. Após 1h a 37°C lavaram-se as placas e incubaram-se com pNPP (Sigma-Aldrich), 1:5000 em tampão BIC, pH 9.8, durante 1h a 37°C. A absorvância da cor resultante foi medida a 405nm. Os títulos de aApoA-I e aApoE foram expressos em µg/mL, segundo curva standard em cada placa, feita a partir de 6 valores standard de aApoA-I ou aApoE.

Anticorpos IgG anti paraoxonase (aPON1)

Neste ensaio usou-se PON1 humana (Abnova, Tebu-bio, Portugal) numa concentração de 1µg/mL, em etanol a 70%, que se colocou em metade da placa de 98 poços, 100µL/poço, deixando evaporar à temperatura ambiente.

As placas foram bloqueadas, com BSA a 1% em PBS, pH 7.4, durante 1h a 37°C. Seguiu-se lavagem com PBS e depois foram então colocadas as amostras de soro e os controlos, diluídos a 1:300 na solução de bloqueio, em todos os poços, incubando 1h a 37°C. Repetiu-se a lavagem e colocou-se o anticorpo secundário anti-IgG humana, conjugado com fosfatase alcalina, diluído a 1:1000 na solução de bloqueio, 1h a 37°C. Depois de 3 lavagens com PBS e 3 com tampão bicarbonato (BIC), pH 9.8, fez-se a reacção colorimétrica, com 100µL/poço de p-nitrofenil fosfato (pNPP, Sigma-Aldrich) 1:5000 em tampão BIC, durante 1h a 37°C. A cor resultante da reacção da fosfatase alcalina com o seu substrato foi lida a 405nm.

Os resultados foram registados como percentagem do controlo positivo de cada placa, após subtração do valor da metade não revestida da placa.

Os ensaios foram efectuados em triplicado e os coeficientes de variação inter e intra placa foram inferiores a 10%.

Doseamento de moléculas de adesão celular (VCAM-1), interleucina -6 (IL-6) e factor de necrose tumoral α (TNF- α)

Foram realizados ensaios por ELISA em kits comerciais (Raybiotech, Tebubio, Portugal), seguindo as instruções do fabricante. Em cada placa é feita uma curva de calibração, a partir de amostras com concentrações de reagentes conhecidas. Foram incluídos controlos de qualidade internos para garantir a reprodutibilidade e rigor do ensaio.

Ensaio por imunoturbidimetria

Quantificação de ApoA-I e ApoE

Foram utilizados kits comerciais Randox, Irlandox (Porto, Portugal) para a quantificação das concentrações séricas de ApoA-I e ApoE, seguindo as instruções do fabricante. Neste ensaio utilizaram-se amostras contendo ApoA ou ApoE e os respectivos anti-soros específicos, formado-se complexos insolúveis que foram lidos por turbidimetria a 340 nm por um aparelho RX Daytona (Randox). A determinação dos valores seguiu a referência padrão da WHO/IFCC¹⁵⁴. Os resultados são expressos em mg/dL. Foram incluídos controlos de qualidade internos para garantir a reprodutibilidade e rigor do ensaio.

Cromatografia de imunoafinidade

Isolamento de IgG aHDL

A cromatografia de afinidade baseia-se na afinidade biológica das macromoléculas. Sobre um suporte cromatográfico inerte fixa-se uma

molécula, imobilizada na matriz, capaz de reter de forma selectiva elementos do soluto, através de uma ligação específica. Esta ligação utiliza as forças de interacção proteína-ligando; neste caso a proteína é HDL, constituindo um bom processo de isolamento de anticorpos específicos.

Neste estudo utilizámos o método anteriormente descrito¹⁵⁵:

Os anticorpos aHDL foram isolados utilizando colunas comerciais HiTrap (em que a matriz é Sepharose, um polímero de agarose) de 1 mL, activadas por NHS (*N*-Hidroxisuccinimida).

As colunas são primeiro preparadas com o ligando, HDL humana, dissolvido em tampão NaHCO_3 0.2M + NaCl 0.5M, com um pH 8.3. Após a adição da solução de HDL, as colunas são seladas e ficam 45 min à temperatura ambiente. Segue-se lavagens sequenciais com dois tampões de diferente pH, um de etenolamina e NaCl, pH 8.3, e outro de acetato e NaCl, pH 4.0, para eliminar moléculas de HDL não especificamente ligadas. Depois de repetidas as lavagens com estes dois tampões, as colunas são lavadas com tampão de NaH_2PO_4 , KCl e NaCl, pH 7.4, ficando prontas a ser usadas. Se não forem usadas de imediato, podem ser armazenadas utilizando um tampão 0.05 M Na_2HPO_4 , 0.1% NaN_3 , com pH 7.

Antes de colocar as amostras de soro dos doentes, as colunas são tratadas com tampão Tris (tris(hidroximetil)aminometano), 20mM, pH 7.5. As amostras são diluídas no mesmo tampão e filtradas através de um filtro Millex GV de 0.22 μm . Depois colocam-se nas colunas, com uma seringa. Os anticorpos não ligados são removidos por lavagem com tampão Tris 20mM, pH 7.5 e depois com tampão Tris 20mM + NaCl 500mM, pH 7.5. Segue-se a eluição dos anticorpos ligados, com 10mL glicina 0.1M, pH 2.5, para tubos contendo 70mL de tampão neutralizador Tris 1M pH 8.8.

Depois da eluição, as colunas são recondicionadas por lavagem com tampão Tris 20mM pH 8.8 e depois Tris 20mM pH 7.5, para poderem ser reutilizadas.

Foi determinada a absorvância (280nm) das fracções de eluição e aquelas que tinham maior absorvância foram testadas por ELISA para confirmar a presença de aHDL. Recolheram-se estas fracções, concentraram-se por evaporação sob nitrogénio e armazenaram-se a -4°C para ulterior teste de actividade biológica.

Estudo funcional

Efeito dos aHDL em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs)

Foram utilizadas placas para cultura de células com 24 poços, onde se colocaram HUVECs em monocamada confluyente, sendo depois incubadas a 37°C, com 5% CO₂, durante 16 horas em diferentes condições:

- Meio M199 (Sigma-Aldrich) suplementado com 1% soro bovino
- HDL humana (1.6 mg/mL), sem anticorpos aHDL
- HDL humana (1.6 mg/mL), com anticorpos aHDL (50 µg/mL) isolados do soro de doentes
- IgG humana não específica (50 µg/mL)

Após lavagem, as células foram incubadas durante 4 horas, no estado basal e depois de estimuladas por TNF- α , 10ng/mL. Após 3 lavagens com PBS, as células foram submetidas a tripsina 0.025% e EDTA 2mM em PBS, durante 3 minutos, à temperatura ambiente, para as remover das placas de cultura. A tripsina foi neutralizada por solução de PBS e depois as células foram centrifugadas a 12000 rpm, durante 5 minutos, recolhendo-se o sobrenadante. Foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-VCAM-1 humano, conjugado com fluoresceína (R&D System), que se adicionou ao meio durante 30 minutos, a

4°C, para corar as células. Efectuou-se lavagem com tampão FACS (PBS contendo 0.1% BSA e 0.01% NaN₃) para remover os anticorpos não ligados. Um citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) mediu a intensidade de fluorescência, traduzindo a expressão de VCAM-1. Os resultados são apresentados como percentagem da expressão basal de VCAM-1.

Um procedimento semelhante, mas sem estimulação por TNF- α foi efectuado para a determinação da expressão de ICAM-1, por MIF (Multiplex fluorescent immunoassay). Foram usadas concentrações de HDL de 0.5mg/mL, 0.7mg/mL e 1mg/mL.

O teste de libertação de desidrogenase láctica confirmou que a viabilidade celular foi sempre >90%. Todas as experiências foram repetidas em triplicado.

Análise estatística

As variáveis categóricas são descritas através de frequências (percentagens) e as variáveis contínuas através da mediana e amplitude interquartil (percentil 25 - percentil 75).

Foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney, Qui-quadrado ou exato de Fisher, conforme adequado.

O estudo das correlações entre as variáveis biológicas foi feito recorrendo ao coeficiente de correlação de Spearman (r_s).

Foi efectuada uma análise de regressão linear para identificar as variáveis independentes que melhor explicam a variabilidade dos níveis de aHDL. Foram consideradas nesta análise características demográficas, clínicas e serológicas. Para os modelos múltiplos foram seleccionadas todas as variáveis

com $p < 0.25$ na análise univariável. O teste de Kolmogorov–Smirnov para ajustamento revelou que se violava o pressuposto da normalidade dos resíduos, pelo que se procedeu à transformação logarítmica da variável IgG aHDL.

Foi considerado um nível de significância $\alpha = 0.05$. A análise dos dados foi efectuada usando o “Statistical Package for the Social Science” para Windows, versão 22.0 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Para os gráficos utilizou-se o Graph Pad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) versão 4.

Resultados

Análise Clínica e epidemiológica

Foram estudados 67 doentes e 50 controlos. Os dois grupos não registaram diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito a idade ($p=0.153$) e sexo ($p=0.709$).

Nos 67 doentes estudados a duração da doença variou entre 8 e 21 anos (mediana 14). Destes doentes, 35 (52%) encontravam-se sob terapêutica biotecnológica, com a seguinte distribuição: etanercept $n=10$, adalimumab $n=16$, infliximab $n=4$, ustakinumab $n=5$. Vinte e um doentes (31.3%) apenas faziam terapêutica tópica e os restantes 11 doentes faziam sistémicos orais em esquemas rotativos, incluindo metotrexato, acitretina e ciclosporina.

Os valores de PASI no dia da observação eram inferiores ou iguais a 10 em 52 doentes (77.6%) e superiores a 10 em 15 doentes (22.4%). Os valores de PASI anteriores ao início de terapêutica sistémica eram inferiores ou iguais a 10 em 23 doentes (34.3%) e superiores a 10 em 44 doentes (65.7%).

Verificou-se no grupo com psoríase um maior índice de massa corporal (IMC) (mediana 26.1, $P_{25}=24$, $P_{75}=29.8$) do que no grupo de controlo ($p=0.043$). Nos doentes havia também níveis aumentados de pressão arterial sistólica ($p=0.001$) mas não de pressão arterial diastólica ($p=0.704$).

Foi feito o diagnóstico de dislipidémia em 16 doentes ($p<0.001$), de HTA em 10 doentes ($p=0.005$), de doença cardiovascular em 5 doentes ($p=0.070$), de diabetes também em 5 doentes ($p=0.070$) e de tabagismo em 21 doentes e 9 controlos ($p=0.29\%$).

A história medicamentosa evidenciou que 14 doentes (20.9%) faziam terapêutica com estatinas ($p<0.001$), 10 tomavam anti-hipertensores

($p=0.005$), 3 tomavam antidiabéticos orais ($p=0.260$), 2 tomavam fibratos ($p=0.506$) e 2 tomavam anti-agregantes plaquetários ($p=0.506$).

Os valores laboratoriais referentes ao perfil lipídico não diferiam significativamente entre os dois grupos.

Estes resultados encontram-se resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Características demográficas e clínicas e perfil lipídico de controlos (CTRL) e doentes com psoríase (PSO)

	CTRL (n=50)	PSO (n=67)	p
Idade (anos)	39.5 (31.8-45.3)	43.0 (33.0-52.0)	0.153 ^a
Sexo feminino n (%)	15 (30.0)	18 (26.9)	0.709 ^b
Peso (Kg)	76.0 (70.0-83.0)	80.0 (70.0-88.0)	0.373 ^a
IMC (Kg/m ²)	25.3 (23.0-27.2)	26.1 (24.0-29.8)	0.043 ^a
Pressão arterial sistólica (mmHg)	120.0 (110.0-126.5)	125.0 (119.0-140.0)	0.001 ^a
Pressão arterial diastólica (mmHg)	74.0 (67.5-80.0)	76.0 (68.0-84.0)	0.704 ^a
Características da psoríase			
Duração da doença (anos)	-	14.0 (8.0-21.0)	-
PASI 0-10/>10 n (%)	-	52 (77.6) / 15 (22.4)	-
PASI 0-10/>10 baseline n(%)	-	23 (34.3) / 44 (65.7)	-
<i>Terapêutica psoríase n (%)</i>			
Tópica	-	21(31.3)	-

Sistémica	-	46 (68.7)	-
Convencional	-	11(16.4)	-
Biológica	-	35 (52.2)	-
<i>História médica n (%)</i>			
Hipertensão arterial	0	10 (14.9)	0.005^c
Dislipidémia	0	16 (23.8)	<0.001^c
Diabetes	0	5 (7.5)	0.070 ^c
Tabagismo	9 (22.0)	21 (31.3)	0.290 ^b
<i>História de DCV</i>			
Coronária	0	1 (1.5)	-
Cerebrovascular	0	4 (6.0)	0.134 ^c
<i>Co-medicação n (%)</i>			
Estatinas	0	14 (20.9)	<0.001^c
Fibratos	0	2 (3.0)	0.506 ^c
Anti-diabéticos	0	3 (4.5)	0.260 ^c
Antihipertensores	0	10 (14.9)	0.005^c
Antiplaquetários	0	2 (3.0)	0.506 ^c
Perfil lipídico			
Colesterol total (mg/dL)	195.3 (179.8-212.9)	188.2 (171.0-212.0)	0.823 ^a
HDL-C (mg/dL)	51.7 (42.9-57.8)	48.0 (41.0-54.8)	0.122 ^a
LDL-C (mg/dL)	148.8 (117.9-174.6)	134.9 (118.0-154.0)	0.234 ^a
Triglicéridos (mg/dL)	107.3 (73.6-157.5)	99.0 (63.0-145.0)	0.584 ^a

Dados apresentados como mediana (P₂₅-P₇₅); ^aTeste exacto de Mann-Whitney; ^bTeste Qui-quadrado;

^cTeste exacto de Fisher.

Discussão

Esta amostra de doentes com psoríase foi efectuada em doentes consecutivos, portanto não houve qualquer seleção específica dos indivíduos recrutados. Porém o facto de o recrutamento ter sido feito num hospital central de referência pode induzir um desvio no sentido de doença com maior gravidade e maior probabilidade de os doentes se encontrarem sob terapêutica sistémica, oral ou biotecnológica.

A gravidade da psoríase foi classificada de acordo com o PASI, em consonância com muitos dos estudos efectuados sobre esta doença. Também as guidelines para decisão terapêutica se baseiam, entre outros, neste índice de avaliação, assim como os ensaios clínicos sobre os fármacos biotecnológicos. Em alternativa poderia usar-se a avaliação da percentagem de tegumento interessada mas este parece-nos um indicador menos adequado pois é possível observar doentes com uma área total de atingimento reduzida ou moderada mas com processos inflamatórios muito intensos nas áreas lesionais.

Considerámos o limite de PASI 10 a partir do qual se classifica a doença como grave. Necessariamente, a classificação da gravidade da doença teria de ser feita conforme os valores anteriores à instituição de terapêuticas sistémicas reconhecidamente eficazes e que alteram significativamente o estado clínico, pelo que apresentamos os valores de PASI na data da observação e também os valores anteriores ao início de terapêutica sistémica. O critério de considerar grave a doença em tratamento com fármacos sistémicos ou biotecnológicos, ou em *screening* para o seu início, teria sido sobreponível. O critério de considerar grave a doença que interessasse mais de 10% da superfície do tegumento teria aumentado o número de doentes classificados como graves.

Quanto ao grupo de controlo, o facto de ter sido recrutado entre dadores de sangue poderá conduzir a um grupo mais saudável e menos medicado do que

grupos de controlo seleccionados noutras populações. Sendo o nosso objectivo principal avaliar os títulos de aHDL, interessava um grupo de controlo que não tivesse características capazes de dificultar a interpretação dos dados (factores de confundimento), sabendo-se que várias patologias estão associadas a alterações funcionais e estruturais das HDL¹⁵⁶ e portanto seriam susceptíveis de dificultar a interpretação de eventuais aumentos dos níveis de aHDL.

Encontramos neste grupo de doentes um conjunto de características clínicas, nomeadamente aumento do IMC, história pessoal de HTA, de doença CV e de diabetes, assim como medicação com estatinas, num padrão não surpreendente pois está totalmente de acordo com a profusa literatura sobre as comorbilidades associadas à psoríase, já anteriormente citada.

O facto de os valores laboratoriais referentes ao perfil lipídico não diferirem significativamente entre os dois grupos deve ser interpretado tendo em consideração que os 16 doentes com história de dislipidémia se encontravam sob terapêutica com estatinas ou fibratos.

Avaliação laboratorial da coorte: marcadores de inflamação e oxidação e determinação de anticorpos anti-lipoproteínas/apoproteínas

Os resultados de investigação laboratorial encontram-se resumidos na Tabela 4.

Quanto aos títulos de auto-anticorpos estudados, verifica-se que este grupo de doentes com psoríase tem níveis muito mais elevados de IgG aHDL do que o grupo de controlo ($p < 0.001$) (Fig. 6), havendo concomitantemente um aumento dos níveis de IgM aHDL, embora neste caso sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0.061$).

Encontra-se também diferença significativa nos títulos de IgG aApoA-I ($p = 0.001$) e de IgG aApoE ($p < 0.001$) (Fig. 7) mas não nos níveis de aPON1 ($p = 0.567$), entre os doentes e os controlos.

Tabela 4. Variáveis biológicas (títulos de anticorpos, marcadores de oxidação e de inflamação) em controlos (CTRL) e em doentes com psoríase (PSO)

	CTRL (n=50)	PSO (n=67)	p [*]
IgG aHDL (% p. controlo)	69.3 (55.1-106.5)	130.9 (97.3-194.2)	<0.001
IgM aHDL (% p. controlo)	105.1 (66.4-156.6)	150.0 (78.6-214.3)	0.061
IgG aPON ₁ (% p. controlo)	48.0 (22.1-71.8)	45.6 (26.1-86.4)	0.567
IgG aApoA-I (µg/mL)	0.4 (0.3-0.5)	0.6 (0.3-1.2)	0.001
IgG aApoE (µg/mL)	0.8 (0.4-1.1)	1.2 (0.8-1.7)	<0.001
Actividade da PON ₁ (U/L)	247.3 (213.4-268.8)	227.7 (174.7-265.3)	0.107
ApoA-I (mg/dL)	162.6 (145.0-181.1)	146.4 (129.0-161.2)	<0.001
ApoE (mg/dL)	3.2 (2.4-4.5)	3.9 (2.9-5.4)	0.031
NO ₂ NO ₃ (µM)	94.3 (77.4-108.9)	103.9 (73.1-132.2)	0.390
VCAM-1 (ng/mL)	142.8 (115.9-169.6)	108.5 (75.5-188.8)	0.054
IL-6 (ng/mL)	2.3 (1.0-6.0)	1.9 (1.3-5.5)	0.886
TNF-α (ng/mL)	74.4 (0.6-290.6)	179.1 (20.8-455.2)	0.086

Abreviaturas: aHDL: anticorpos anti-lipoproteínas de alta densidade; aPON₁: anticorpos anti-paraoxonase 1; aApoA-I: anticorpos anti-apoproteína A-I; aApoE: anticorpos anti-apoproteína E; PON₁: paraoxonase 1; ApoA-I: apoproteína A-I; Apo E: apoproteína E; NO₂⁻: nitrito; NO₃⁻: nitrato; VCAM-1: molécula de adesão de célula vascular 1; IL-6: interleucina-6; TNF-α: factor de necrose tumoral alpha. Dados apresentados como mediana (P₂₅-P₇₅). *Teste exacto de Mann-Whitney.

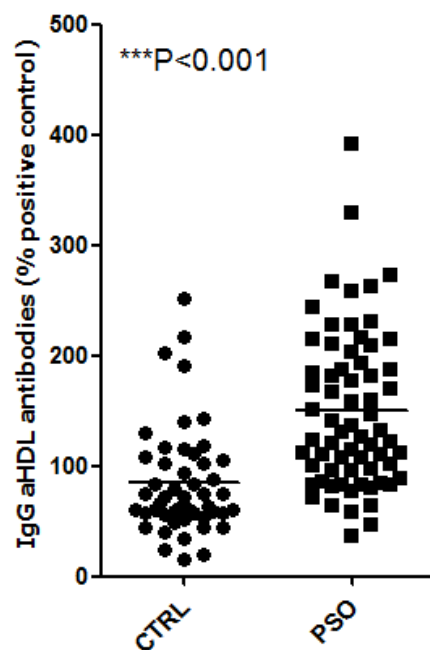


Figura 6 - Títulos de anticorpos IgG anti-HDL em controlos (CTRL) e em doentes com psoríase (PSO)

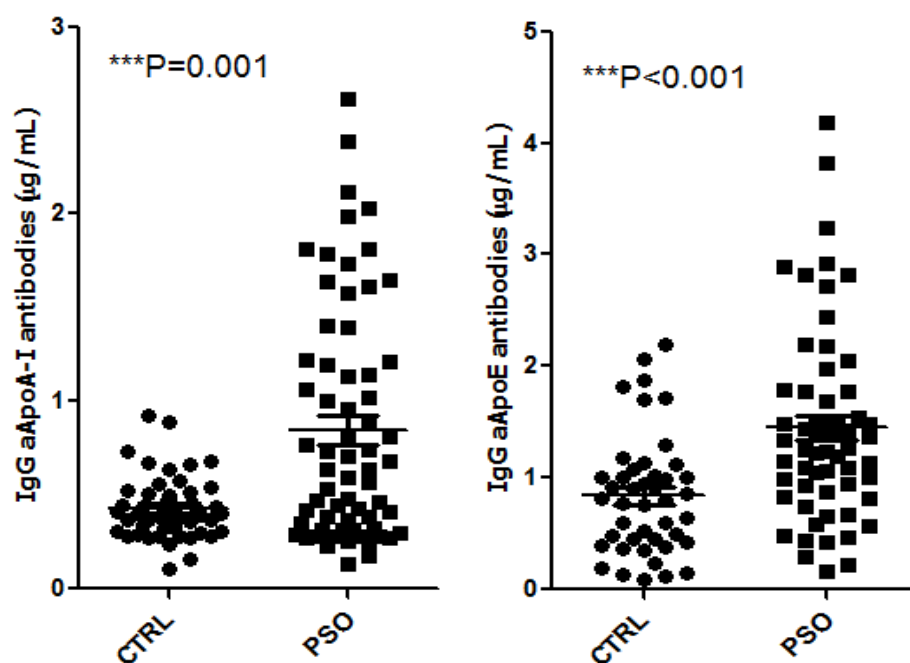


Figura 7 - Títulos de anticorpos IgG anti-apoproteína A-I e anti-apoproteína E em controlos (CTRL) e em doentes com psoríase (PSO)

Os títulos de aHDL e aApoE são significativamente mais elevados nos doentes com psoríase grave (Fig. 8), com valores de $p=0.010$ e $p=0.018$, respectivamente. Os títulos de aApoA-I são também mais elevados na psoríase grave mas sem atingir significado estatístico ($p=0.110$).

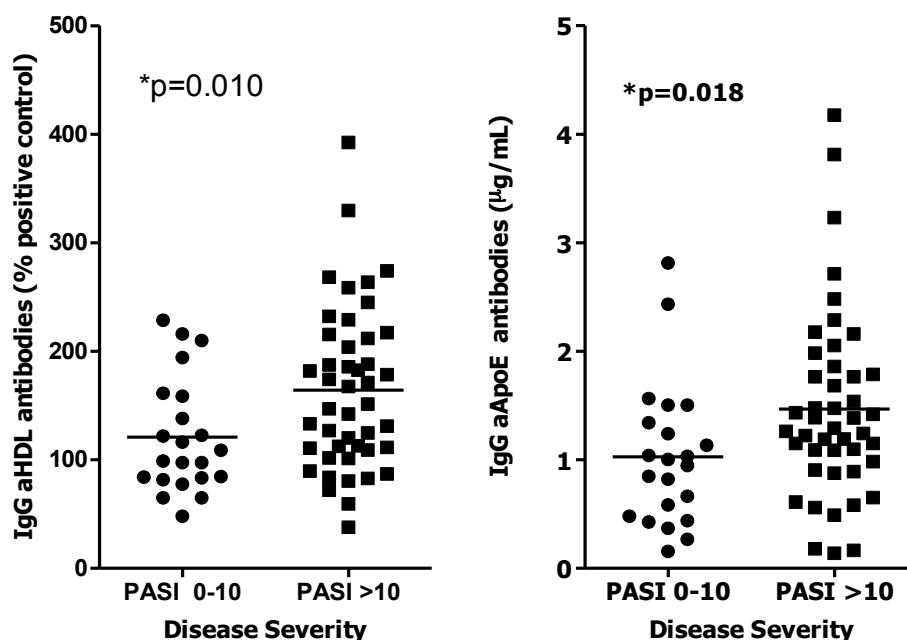


Figura 8 - Relação entre os títulos de anticorpos IgG anti-HDL e anti-ApoE e a gravidade da psoríase

Observou-se uma correlação positiva entre os títulos de IgG aHDL e de aApoA-I ($r=0.432$, $p<0.001$) e também entre os títulos de IgG aHDL e de aApoE ($r=0.339$, $p<0.001$).

Não existe correlação entre os títulos de anticorpos e a duração da doença nem entre estes títulos e a idade do sujeito. Também não se encontrou correlação com marcadores de oxidação ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) e de inflamação, nomeadamente PCR, VCAM-1, IL-6 e TNF- α .

Os doseamentos de apoproteínas séricas revelaram uma redução dos níveis de ApoA-I ($p<0.001$) e um aumento dos níveis de ApoE ($p=0.031$) nos doentes, em comparação com o grupo de controlo. Não se observou correlação entre os

níveis séricos de apoproteínas e os títulos de qualquer dos anticorpos estudados.

A comparação entre os doentes sob terapêutica tópica (n=21) e os doentes sob terapêutica sistémica (n=46) não revelou diferença significativa para qualquer dos anticorpos estudados: IgG aHDL (p=0.624), aApoA-I (p=0.122) e aApoE (p=0.357).

Os níveis de metabolitos do óxido nítrico, medidos como marcadores de oxidação, não mostraram diferença no total de nitritos+nitratos (p=0.390).

Os marcadores de inflamação VCAM-1, IL-6 e TNF- α não mostraram diferenças significativas entre os dois grupos, com valores p=0.918, p=0.786, e p=0.334, respectivamente. Também não se encontrou diferença nestes parâmetros entre os doentes sob terapêutica tópica exclusiva ou sob terapêutica sistémica, embora todos os marcadores estudados tenham um nível médio mais elevado nos doentes do grupo sob terapêutica tópica exclusiva.

Análise de regressão linear

Foi feita a análise univariável para toda a população estudada, contemplando todas as variáveis demográficas, clínicas, biológicas e imunológicas: tabela 5. A análise univariável por grupos encontra-se nas tabelas 6 e 7.

Tabela 5. Análise univariável geral

	$\hat{\beta}$	IC 95%	p
Grupo psoríase	0.619	0.428, 0.810	<0.001
Sexo	-0.03	-0.28, 0.21	0.784
Idade (anos)	-0.01	-0.01, 0.09	0.823
Colesterol HDL	-0.01	-0.21, -0.001	0.031
Colesterol LDL	-0.002	-0.005, 0.001	0.147
Colesterol total	-0.002	-0.004, 0.001	0.269
Triglicéridos	-0.001	-0.016, 0.014	0.900
Peso (Kg)	0.002	-0.006, 0.01	0.583
Pressão sistólica	0.001	-0.007, 0.009	0.781
Pressão diastólica	-0.004	-0.014, 0.007	0.493
Tabagismo	-0.169	-0.430, 0.093	0.204
IMC (Kg/m ²)	0.10	-0.16, 0.036	0.467
Diabetes	0.189	-0.354, 0.731	0.492
HTA	0.442	0.058, 0.827	0.025
Obesidade	0.347	0.024, 0.669	0.035
Dislipidémia	0.242	-0.094, 0.578	0.156
Doença coronária	0.053	-1.141, 1.248	0.930
Doença	0.234	-0.370, 0.838	0.444
IgM aHDL (%)	0.001	-0.001, 0.001	0.918
aPON ₁ (% controlo)	0.004	0.001, 0.006	0.002
aApoA-I (μg/mL)	0.278	0.120, 0.436	0.001
aApoE (μg/mL)	0.260	0.122, 0.399	0.0001
Actividade da PON ₁	-0.001	-0.003, 0.001	0.385
ApoA-I (mg/dL)	-0.003	-0.007, 0.001	0.165
ApoE (mg/dL)	0.018	-0.041, 0.076	0.552
NO ₂ +NO ₃ (μM)	0.001	-0.001, 0.003	0.312
VCAM-1 (ng/mL)	-0.001	-0.003, 0.001	0.402
IL-6 (pg/mL)	-0.017	-0.029, -0.004	0.008
TNF-α (pg/mL)	0.0001	0.0001, 0.0001	0.127
Estatinas	0.313	-0.021, 0.647	0.066
Fibratos	-0.289	-1.136, 0.558	0.501
Antiagregantes	0.706	-0.132, 1.545	0.098
Antidiabéticos	0.389	-0.303, 1.081	0.267

aHDL: anticorpos anti-lipoproteínas de alta densidade; aPON₁: anticorpos anti-paraoxonase 1; aApoA-I: anticorpos anti-apoproteína A-I; aApoE: anticorpos anti-apoproteína E; PON₁: paraoxonase 1; ApoA-I: apoproteína A-I; Apo E: apoproteína E; NO₂: nitrito; NO₃⁻: nitrato; VCAM-1: molécula de adesão de célula vascular 1; IL-6: interleucina-6; TNF-α: factor de necrose tumoral alpha.

Tabela 6. Análise univariável do grupo psoríase

	$\hat{\beta}$	IC 95%	p
Sexo	0.031	-0.234, 0.296	0.817
Idade (anos)	-0.001	-0.010, 0.009	0.902
Colesterol HDL (mg/dL)	0.001	-0.011, 0.014	0.828
Colesterol LDL (mg/dL)	-0.002	-0.006, 0.001	0.193
Colesterol total (mg/dL)	-0.003	-0.006, 0.000	0.070
Triglicéridos (mg/dL)	-0.001	-0.003, 0.001	0.234
Peso (Kg)	-0.002	-0.009, 0.005	0.614
Pressão sistólica (mm Hg)	-0.005	-0.013, 0.002	0.179
Pressão diastólica (mmHg)	-0.002	-0.012, 0.008	0.655
Tabagismo	-0.144	-0.396, 0.107	0.257
PASI actual	0.002	-0.009, 0.013	0.733
Baseline PASI	0.026	0.014, 0.039	<0.001
Gravidade da psoríase	0.300	0.064, 0.536	0.014
Duração da psoríase	-0.001	-0.013, 0.011	0.865
Terapêutica biológica	0.166	-0.66, 0.397	0.159
IMC (Kg/m ²)	-0.012	-0.034, 0.011	0.311
PCR (mg/dL)	-0.009	-0.044, -0.026	0.622
Diabetes	-0.091	-0.537, 0.356	0.687
HTA	0.165	-0.163, 0.492	0.319
Obesidade	0.049	-0.233, 0.331	0.731
Dislipidémia	-0.065	-0.353, 0.224	0.656
Doença coronária	-0.215	-1.183, 0.753	0.659
Doença cerebrovascular	-0.041	-0.537, 0.455	0.869
IgM anti-HDL (% controlo)	-0.001	-0.002, 0.0001	0.037
Anti-PON1 (% controlo)	0.003	0.0001, 0.005	0.022
aApoAI (µg/mL)	0.112	-0.031, 0.256	0.123
aApoE (µg/mL)	0.158	0.020, 0.297	0.026
Actividade da PON1 (U/L)	0.001	-0.001, 0.003	0.366
ApoA-I (mg/dL)	0.001	-0.003, 0.005	0.637
ApoE (mg/dL)	-0.025	-0.082, 0.032	0.379
NO ₂ +NO ₃ (µM)	0.0001	-0.001, 0.002	0.868
VCAM-1 (ng/mL)	0.0001	-0.002, 0.002	0.874
IL-6 (pg/mL)	-0.022	-0.037, -0.007	0.004
TNF-α (pg/mL)	0.0001	-0.001, 0.002	0.698
Estatinas	0.014	-0.275, 0.304	0.922
Fibratos	-0.565	-1.242, 0.111	0.100
Antiagregantes	0.443	-0.239, 1.125	0.199
Antidiabéticos	0.12	-0.447, 0.688	0.673

aHDL: anticorpos anti-lipoproteínas de alta densidade; aPON1: anticorpos anti-paraoxonase 1; aApoA-I: anticorpos anti-apoproteína A-I; aApoE: anticorpos anti-apoproteína E; PON1: paraoxonase 1; ApoA-I: apoproteína A-I; Apo E: apoproteína E; NO₂: nitrito; NO₃⁻: nitrato; VCAM-1: molécula de adesão de célula vascular 1; IL-6: interleucina-6; TNF-α: factor de necrose tumoral alpha.

Tabela 7. Análise univariável do grupo controlo

	$\hat{\beta}$	IC 95%	p
Sexo	-0.168	-0.516, 0.180	0.337
Idade (anos)	-0.014	-0.031, 0.003	0.111
Colesterol HDL (mg/dL)	-0.013	-0.026, 0.000	0.057
Colesterol LDL (mg/dL)	-0.001	-0.004, 0.003	0.743
Colesterol total (mg/dL)	0.000	-0.004, 0.004	0.834
Triglicéridos (mg/dL)	0.014	-0.005, 0.033	0.145
Peso (Kg)	0.005	-0.015, 0.024	0.636
Pressão sistólica (mmHg)	-0.009	-0.024, 0.007	0.258
Pressão diastólica (mmHg)	-0.009	-0.027, 0.009	0.309
Tabagismo	-0.456	-0.887, -0.025	0.257
IMC (Kg/m ²)	0.018	-0.049, 0.085	0.594
IgM anti-HDL (% controlo)	0.009	-0.009, 0.028	0.323
Anti-PON ₁ (% controlo)	0.080	0.003, 0.156	0.041
aApoA-I (μg/mL)	0.063	-0.034, 0.160	0.197
aApoE (μg/mL)	0.113	-0.182, 0.408	0.444
Actividade da PON ₁ (U/L)	-0.002	-0.006, 0.002	0.353
ApoA-I (mg/dL)	0.001	-0.008, 0.008	0.982
ApoE (mg/dL)	-0.008	-0.117, 0.101	0.886
NO ₂ +NO ₃ (μM)	-0.001	-0.008, 0.005	0.670
VCAM-1 (ng/mL)	-0.001	-0.004, 0.002	0.574
IL-6 (pg/mL)	-0.010	-0.026, 0.006	0.222
TNF-α (pg/mL)	0.001	-0.005, 0.007	0.715

aHDL: anticorpos anti-lipoproteínas de alta densidade; aPON₁: anticorpos anti-paraoxonase 1; aApoA-I: anticorpos anti-apoproteína A-I; aApoE: anticorpos anti-apoproteína E; PON₁: paraoxonase 1; ApoA-I: apoproteína A-I; Apo E: apoproteína E; NO₂: nitrito; NO₃⁻: nitrato; VCAM-1: molécula de adesão de célula vascular 1; IL-6: interleucina-6; TNF-α: factor de necrose tumoral alpha.

Após a análise univariável, foi obtido inicialmente um modelo múltiplo com o intuito de explicar a variabilidade do IgG aHDL através do grupo com doença e dos três auto-anticorpos aApoA-I, aApoE e aPON₁ (facto este que permitiu que o aApoA-I permanecesse no modelo ainda que sem significado estatístico), atingindo-se um R²=0.355 (tabela 8). Trata-se, portanto, de um modelo que explica 35.5% da variabilidade dos títulos de aHDL.

Tabela 8. Modelo multivariável só com grupo e anticorpos ($R^2=0.355$)

	Exp ($\hat{\beta}$) (IC 95%)	p
Grupo de doença	1.63 (1.33,2.01)	<0.001
aApoA-I	1.07 (0.92,1.25)	0.345
aApoE	1.15 (1.02,1.31)	0.029
aPON1*	1.06 (1.02,1.10)	0.007

aApoA-I: anticorpos anti-apoproteína A-I; aApoE: anticorpos anti-apoproteína E; aPON1: anticorpos anti-paroxonase 1; * por aumentos de 20 unidades

Foi também estudado o modelo contendo os 3 anticorpos estratificado por grupos (tabelas 9 e 10), encontrando-se significado estatístico apenas para aPON1 ($p=0.020$) no grupo controlo e para aApoE no grupo com psoríase ($p=0.050$).

Tabela 9. Modelo multivariável só com anticorpos no grupo com psoríase ($R^2=0.149$)

	Exp ($\hat{\beta}$) (IC 95%)	p
aApoA-I	1.07 (0.93,1.24)	0.344
aApoE	1.15 (1.00,1.33)	0.050
aPON1*	1.04 (0.99,1.09)	0.092

aApoA-I: anticorpos anti-apoproteína A-I; aApoE: anticorpos anti-apoproteína E; aPON1: anticorpos anti-paroxonase 1; * por aumentos de 20 unidades

Tabela 10. Modelo multivariável só com anticorpos no grupo controle ($R^2=0.154$)

	Exp ($\hat{\beta}$) (IC 95%)	p
aApoA-I	1.87 (0.74,4.66)	0.180
aApoE	1.24 (0.93,1.65)	0.147
aPON ₁ [*]	1.10 (1.02,1.19)	0.020

aApoA-I: anticorpos anti-apoproteína A-I; aApoE: anticorpos anti-apoproteína E; aPON₁: anticorpos anti-paraoxonase 1; * por aumentos de 20 unidades

A análise multivariável prosseguiu, adicionando as variáveis demográficas, clínicas e biológicas, com $p<0.25$. O modelo final é composto pelas variáveis grupo de doença, IL-6, aPON₁ e aApoE (Tabela 11), que no seu conjunto explicam 40.2% da variabilidade dos títulos de IgG aHDL ($R^2=0.402$).

Tabela 11. Modelo multivariável ($R^2=0.402$)

	Exp ($\hat{\beta}$) (IC 95%)	p
Grupo de doença	1.66 (1.37,2.00)	<0.001
IL-6	0.99(0.97,1.00)	0.003
aPON ₁ [*]	1.06 (1.02,1.10)	0.005
aApoE	1.19 (1.04,1.34)	0.009

IL-6: interleucina 6, aPON₁: anticorpos anti-paraoxonase 1, aApoE: anticorpos anti-apoproteína E; * por aumentos de 20 unidades

Por último, foi efectuada uma análise de regressão linear multivariável, estratificada por grupo (tabela 12), revelando que no grupo com psoríase a única variável clínica que se associa significativamente com os títulos de IgG aHDL é a gravidade da doença ($p < 0.001$, $\exp(\hat{\beta}) = 1.02$: por cada aumento de uma unidade no PASI, existe um aumento de 2% no título de IgG aHDL). No grupo controlo verificou-se relação com a idade ($p = 0.002$, $\exp(\hat{\beta}) = 0.97$: por cada aumento de 1 ano na idade, é esperada uma diminuição de 3% no título de IgG aHDL) e o IMC ($p = 0.045$, $\exp(\hat{\beta}) = 1.07$: por cada aumento de uma unidade no IMC, é esperado um aumento de 7% no título de IgG aHDL).

Tabela 12. Análise de regressão linear multivariável estratificada por grupo

	Exp ($\hat{\beta}$) (IC 95%)	p
Grupo com psoríase		
aApoE	1.17 (1.04,1.31)	0.010
IL-6	0.98 (0.97,0.99)	0.001
Baseline PASI	1.02 (1.01,1.04)	<0.001
Grupo de controlo		
Idade	0.97 (0.95,0.99)	0.002
IMC	1.07 (1.00,1.15)	0.045

IL-6: interleucina 6; aApoE: anticorpos anti-apoproteína E; IMC: índice de massa corporal

Discussão

Este estudo mostra que os títulos de anticorpos IgG aHDL, aApoA-I e aApoE são significativamente mais elevados nos doentes com psoríase, especialmente em doentes graves. Estes resultados sugerem que a maior produção de IgG aHDL pode ser uma explicação para a associação entre maior gravidade da psoríase e maior risco CV. Esta hipótese é também corroborada pela ausência de diferença significativa nos anticorpos IgM aHDL, o que favorece a conclusão de que a produção de IgG aHDL será resposta adaptativa.

Um possível factor de confundimento seria a idade, pois está demonstrada a associação da idade com alterações estruturais e funcionais das partículas de HDL¹⁵⁷, porém nesta amostra o teste de correlação de Spearman mostra que não há correlação entre a idade e os títulos de IgG aHDL, registando-se até uma correlação negativa se considerarmos o grupo controlo isoladamente.

A correlação positiva entre IgG aHDL e aApoA-I e aApoE é coerente com o facto de estas serem importantes apoproteínas constituintes das partículas de HDL e mostra que são alvos relevantes dos anticorpos aHDL. Claramente, a grande complexidade das partículas de HDL faz prever que diferentes epitopos possam ser alvo de auto-anticorpos, provavelmente com expressões variáveis em diferentes contextos clínicos. Sabemos, por exemplo, que os anticorpos aApoA-I são muito relevantes nos doentes com LES¹⁴⁴, nos doentes com patologia CV^{148,150} e na diabetes tipo II¹⁵¹, enquanto os anticorpos aPON1 são mais relevantes na AR¹⁵⁸. Os anticorpos aApoE não estão ainda descritos na literatura, em qualquer patologia, mas tendo em consideração as importantes funções ateroprotectoras desempenhadas pela ApoE, é plausível que os anticorpos aApoE sejam relevantes na patogénese da aterosclerose associada a psoríase. Nesta amostra, a análise de regressão mostra que a variabilidade dos títulos de IgG aHDL depende mais dos níveis de aApoE do que dos níveis de aApoA-I.

A ausência de correlação entre os anticorpos aHDL e os marcadores de inflamação e oxidação está de acordo com a ausência de diferença entre os dois grupos quanto a estes marcadores. Será de considerar que 68.7% dos doentes estava sob terapêutica sistémica à data das colheitas (dos quais 76% biotecnológica), o que poderá ter normalizado estes marcadores, que são muito mais alteráveis do que a produção de IgG. Esta hipótese é corroborada pelos níveis superiores, embora sem diferença significativa, destes marcadores nos doentes sob terapêutica tópica exclusiva, sugerindo que no grupo sob terapêutica sistémica os valores podem ter descido por actividade dos fármacos.

Os níveis séricos de apoproteínas na psoríase têm sido alvo de interesse desde há muito, verificando-se em vários estudos, tal como no nosso grupo, aumento dos níveis séricos de ApoE¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Quanto à ApoA-I, os resultados são mais variáveis, a maioria mostrando níveis elevados desta apoproteína ou ausência de diferença⁸⁴, ao contrário do nosso grupo, em que os níveis de ApoA-I estão diminuídos, tal como no estudo de Holzer¹³⁰. É importante lembrar que a redução de ApoA-I está associada a maior risco CV¹⁶².

A análise multivariável mostra que vários factores contribuem para a variabilidade dos títulos de IgG aHDL, sendo que o modelo constituído pelas variáveis grupo de doença e conjunto dos anticorpos aApoA-I, aApoE e aPON₁ explica apenas 35% desta variabilidade, sugerindo que podem existir outros alvos antigénicos nas partículas de HDL além das apoproteínas que estudámos, ApoA-I e ApoE, e da enzima PON₁. Salienta-se que, nesta análise, é mais relevante o contributo dos aApoE (ainda não referidos na literatura) do que o dos aApoA-I.

Actividade biológica dos anticorpos aHDL: estudos funcionais *in vitro*

As moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 são importantes no processo de recrutamento de leucócitos circulantes para a parede vascular. Este recrutamento constitui um primeiro passo fundamental da activação imunológica que caracteriza a aterogénese.

A expressão de VCAM-1 nas células endoteliais não é constitucional, surge como resposta a estímulos inflamatórios, como o TNF- α . O estudo da inibição de expressão de VCAM-1 em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs), após estimulação com TNF- α , mostrou que a adição de HDL bloqueia esta expressão e que a adição de IgG aHDL de doentes com psoríase impede este efeito, ao contrário da adição de IgG humana inespecífica (Fig. 9).

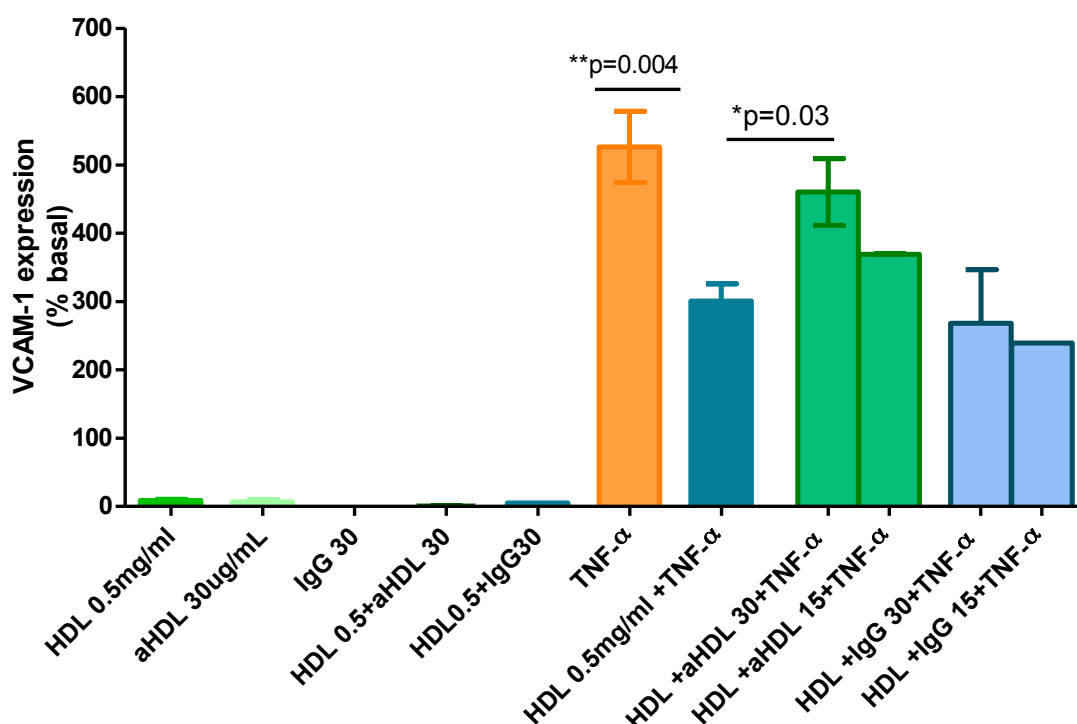


Figura 9 – Efeito da adição de IgG aHDL e de IgG humana inespecífica no bloqueio da expressão de VCAM-1 em células endoteliais de veia umbilical humana estimuladas por TNF- α .

O estudo funcional dos aHDL *in vitro* incluiu também um ensaio de expressão de ICAM-1 em HUVECs. Tratando-se de uma molécula de adesão que é constitucionalmente expressa nestas células, não é necessária estimulação prévia com TNF- α . Na figura 10 vemos que só conseguimos inibir a expressão de ICAM-1 com concentrações elevadas de HDL (1 mg/mL) e este efeito inibidor não foi abolido pela adição de IgG aHDL dos doentes nem pela adição de IgG humana inespecífica.

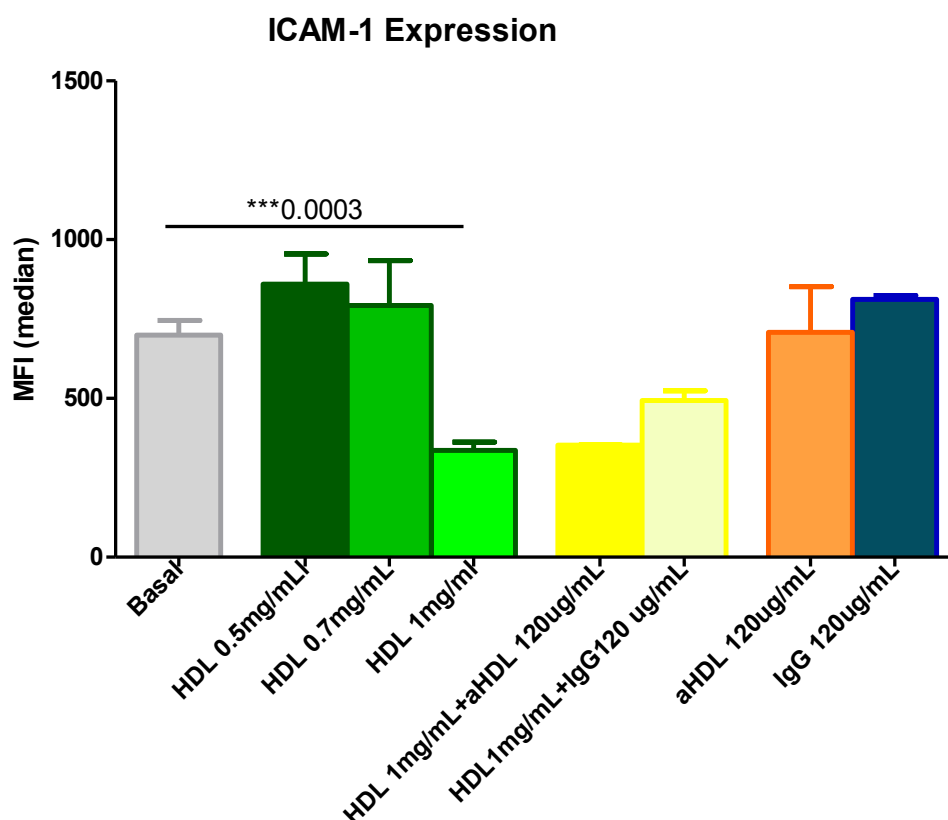


Figura 10 – Efeito da adição de IgG aHDL e de IgG humana inespecífica no bloqueio da expressão de ICAM-1 em células endoteliais de veia umbilical humana.

Discussão

Estes resultados mostram que os anticorpos aHDL dos doentes com psoríase têm actividade biológica *in vitro*, conseguindo bloquear o efeito anti-inflamatório das HDL em células endoteliais e conduzindo a um estado de maior activação endotelial, traduzido pelo aumento de expressão de VCAM-1.

Os resultados obtidos no ensaio de expressão de ICAM-1 são de difícil interpretação, uma vez que esta é uma molécula de adesão constitucionalmente expressa pelas células endoteliais, independentemente de estimulação por citocinas inflamatórias. Nesta experiência, só se conseguiu inibir a expressão de ICAM-1 com uma concentração muito alta de HDL (1 mg/mL) o que pode explicar a incapacidade da IgG aHDL de reverter este efeito.

Discussão final

Vários autores^{163,164} referem a importância de novos factores de risco associados a auto-imunidade contribuindo, em interacção com os factores de risco clássicos, para o desenvolvimento de aterosclerose (tabela 13) e que devem ser tidos em consideração na avaliação global do risco e das estratégias terapêuticas para estes doentes.

Tabela 13. Factores de risco para aterosclerose: tradicionais e relacionados com auto-imunidade

Factores de risco tradicionais	Novos factores de risco
Obesidade	Doença auto-imune (AR, LES, psoríase, diabetes tipo 1)
Hiperhomocisteinemia	
Dislipidémia	Poli-auto-imunidade
Idade	Actividade da doença auto-imune
História familiar de doença CV	Autoanticorpos (FR, aCit, aOX-LDL, aCard, aApoA-I, aβ ₂ g ₁)
Síndrome metabólico	Estado pro-inflamatório crónico (PCR, VS, piHDL)
Diabetes tipo 2	
HTA	Antecedentes familiares de auto-imunidade
Tabagismo	Corticoterapia sistémica
Sexo masculino	Outras terapêuticas (MTX, leflunomida, AINE)
Estilo de vida	

CV: cardiovascular; AR: artrite reumatóide; LES: lupus eritematoso sistémico; FR: factor reumatóide, aCIT: anti-citrulina; aOX-LDL: anti-LDL oxidada; aCar: anti-cardiolipina; aApoA-I: anti-apoproteína A-I; aβ₂g₁: anti-β₂ glicoproteína 1; PCR: proteína C reactiva; VS: velocidade de sedimentação; piHDL: HDL pró-inflamatória

Neste estudo foi demonstrada pela primeira vez a presença de títulos elevados de anticorpos IgG aHDL, aApoA-I e aApoE em doentes com psoríase. A relevância patogénica destes anticorpos na aterogénese associada a psoríase é sugerida pela sua associação com a gravidade da doença e pela demonstração da sua actividade biológica *in vitro*.

Os alvos das partículas de HDL que primeiro investigámos foram a ApoA-I e a PON₁, pois são os que têm sido descritos na literatura como relevantes noutras patologias associadas a aterosclerose. Os anticorpos aApoA-I são os mais extensamente estudados e está demonstrado o seu papel aterogénico na doença CV, através da ligação aos TLR2 e TLR4, desencadeando respostas pró-inflamatórias¹⁵⁰. São relevantes na patogénese e como marcadores de risco CV na doença coronária aguda, artrite reumatóide¹⁶⁵, diabetes tipo II¹⁵¹ e LES^{143,165}. Os anticorpos aPON₁ alteram a capacidade funcional da enzima PON₁, impedindo a sua actividade anti-oxidante, conforme está demonstrado na artrite reumatóide¹⁶⁶. Contudo, neste grupo de estudo não encontramos níveis aumentados de aPON₁ nem redução da actividade da PON₁, o que sugere um perfil aterogénico diferente do que se observa no LES e na artrite reumatóide.

Para investigar outros tipos de aHDL, além dos aApoA-I e aPON₁, montámos o método para determinação de anticorpos aApoE e verificámos que os doentes com psoríase tinham efectivamente níveis aumentados deste anticorpo e que os seus títulos se correlacionam positivamente com os títulos de aHDL e com a gravidade da doença, de forma ainda mais significativa do que os níveis de aApoA-I.

Estes resultados estão em consonância com a reconhecida importância da ApoE como factor anti-aterogénico e sua interacção com a ApoA-I¹⁶⁷. Não temos conhecimento de qualquer referência na literatura da existência de anticorpos aApoE associados a qualquer patologia humana definida.

O modelo de regressão multivariável só com os anticorpos aApoA-I, aApoE e aPON tem um valor de $R^2=0,355$, ou seja, no seu conjunto, estes 3 anticorpos apenas explicam 35.5% da variabilidade dos títulos de IgG aHDL. O modelo final que melhor explica a variabilidade dos anticorpos aHDL, neste estudo, tem um valor de $R^2=0,402$, explicando 40.2%. Sendo já um valor relevante, sublinha-se a necessidade de prosseguir o estudo dos vários componentes dos aHDL e dos diversos factores que podem interferir na sua produção e actividade.

Estes resultados, em conjunto com os anteriormente obtidos noutras patologias, sugerem que os anticorpos aHDL constituem uma família de auto-anticorpos que pode incluir diferentes padrões em diferentes patologias, o que poderá ter implicações na sua utilidade como biomarcadores.

Embora não possa ser concluída qualquer relação causal do estudo efectuado, é plausível que os níveis aumentados de aHDL possam ser um dos mecanismos explicativos da associação entre aterosclerose e psoríase. Tal como em outras patologias, também na psoríase os auto-anticorpos aHDL podem tornar as partículas de HDL disfuncionais e portanto aterogénicas. É também claro o seu potencial como biomarcadores de risco CV na psoríase, conforme já está estabelecido noutras patologias.

Este foi um estudo exploratório, transversal, efectuado num grupo de doentes heterogéneo quanto às terapêuticas instituídas e quanto à duração das terapêuticas em curso. Estes pontos são partilhados pela esmagadora maioria dos estudos transversais em doentes com psoríase, o que pode dificultar algumas análises comparativas, porém a alternativa seria não fazer um recrutamento sequencial mas sim com critérios de selecção, o que iria introduzir um viés. Também não me pareceu plausível que uma resposta biológica como a produção de IgG pudesse ser suficientemente suprimida pela actividade anti-inflamatória dos fármacos. Já quanto aos valores dos

marcadores de oxidação e inflamação, é provável que possam ter sido alterados pela terapêutica.

Não seria adequado fazer sub-análises por grupo terapêutico pois teríamos grupos de dimensão muito reduzida. Não obstante, a comparação entre o grupo sob terapêutica exclusivamente tópica (n=21) e o grupo sob terapêutica sistémica (oral ou biotecnológica; n=46) não mostrou diferença nos níveis de anticorpos. É de notar que no grupo sob terapêutica tópica se encontram alguns indivíduos com doença grave, candidatos a terapêutica sistémica mas que ainda não a tinham iniciado à data das colheitas de sangue, pelo que não há sobreposição entre estes sub-grupos e os resultantes da separação por valor de PASI.

Este estudo não permite concluir se há relação causal entre a psoríase e os níveis aumentados de anticorpos, nem entre esses níveis e o risco CV dos doentes com psoríase.

Tem, no entanto, a utilidade de colocar todas estas novas questões, propondo uma nova explicação mecanística para a associação entre psoríase e aterosclerose, assim como eventuais novos biomarcadores de risco CV em doentes com psoríase, com implicações práticas na identificação precoce dos doentes em maior risco, permitindo a adopção de medidas preventivas e a selecção de estratégias terapêuticas mais personalizadas, atempadas e eficazes.

Considerações finais

Apresenta-se e discute-se nesta tese um projecto de investigação translaccional e transversal, envolvendo componentes clínicas e laboratoriais e obrigando a uma colaboração estreita entre o trabalho clínico e o laboratório.

O nosso grupo tem vindo a demonstrar que os anticorpos contra diferentes componentes das partículas de HDL constituem um nova e ainda muito desconhecida família de auto-anticorpos, com capacidade para interferir com as partículas de HDL, tornando-as disfuncionais. Neste estudo demonstra-se pela primeira vez a existência de elevados níveis de anticorpos aHDL em doentes com psoríase, a sua associação com a gravidade da doença e o seu potencial patogénico pró-inflamatório nos ensaios *in vitro*. Caracterizámos esses anticorpos nesta doença como sendo fundamentalmente aApoA-I, aApoE e, com menor relevância, aPON₁. Foi a primeira demonstração da presença de aApoE, um novo membro desta família em estudo, salientando-se a sua relação com a gravidade da doença e com a variabilidade dos títulos de aHDL.

Sublinha-se a importância da identificação de possíveis novos biomarcadores de risco CV em doentes com psoríase, que possam ajudar a identificar e tratar precocemente os doentes em maior risco, dentro desta vasta e heterogénea população.

Divulgação de resultados

A divulgação dos resultados deste estudo deu origem a três artigos, enviados para publicação:

Paiva-Lopes MJ, Alves, JD. Psoriasis-associated vascular disease: the role of HDL. Aprovado pelo Journal of Biomedical Science.

Paiva-Lopes MJ; Batuca JR; Gouveia S; Alves M; Papoila, AL; Alves JD. Antibodies towards high-density lipoproteins components in patients with psoriasis; submetido para o Journal of Biomedical Science.

Paiva-Lopes MJ, Batuca JR, Alves, JD. IgG anti-high density lipoprotein antibodies from psoriasis patients block anti-inflammatory effects of high-density lipoproteins; submetido para o Experimental Dermatology.

Este estudo foi apresentado, em poster, nas seguintes reuniões científicas:

Paiva-Lopes MJ, Batuca JR, Gouveia S, Faleiro I, Alves JD. Antibodies towards high density lipoproteins components in patients with psoriasis. 4th World Psoriasis and Psoriatic Arthritis Conference. Stockholm, Sweden July 2015

Paiva-Lopes M J, Gouveia S, Faleiro I, Batuca J, Delgado Alves J. Humoral response against lipoproteins in patients with Psoriasis. 24th EADV Congress Copenhagen 2015

Paiva-Lopes MJ, Batuca JR, Gouveia S, Alves JD. Resposta humoral contra lipoproteínas de alta densidade em doentes com psoríase. III Forum Imunologia Janssen. Aveiro, Maio 2017.

Projectos de trabalhos futuros

O estudo da psoríase tem vindo a modificar progressiva mas drasticamente o seu paradigma explicativo ao longo das últimas três décadas. Este progresso no entendimento dos processos fisiopatológicos e das comorbilidades associadas conduziu ao desenvolvimento de novas e notáveis armas terapêuticas e a uma nova abordagem do doente como um todo, tendo em conta que os processos oxidativos e inflamatórios subjacentes à psoríase são sistémicos e crónicos.

A associação entre psoríase e doença CV tem certamente variadas explicações ainda por explorar. Estando o nosso grupo de investigação dedicado ao estudo da resposta imunológica na doença vascular, prosseguiremos o nosso trabalho nesta área.

Actualmente está em curso a continuação do estudo da actividade biológica dos aHDL dos doentes com psoríase, com ensaios de expressão de VEGF.

O estudo dos anticorpos contra diferentes componentes das partículas de HDL será prolongado pois a enorme complexidade e heterogeneidade destas partículas irá dificultar a tarefa. Para além das apoproteínas reconhecidamente mais importantes para as funções anti-aterogénicas das HDL, seria também interessante estudar eventuais anticorpos contra os constituintes lipídicos mais relevantes, dado que o estudo do lipidoma tem demonstrado a grande importância deste componente nas funções ateroprotectoras das HDL^{168,169}.

Na sequência da identificação de anticorpos aApoE, seria interessante a determinação dos genótipos de ApoE na população portuguesa com psoríase e nos alvos antigénicos dos aApoE.

Outra vertente será a análise dos eventuais efeitos dos aHDL de doentes com psoríase na actividade de células dendríticas, pela importância destas células

na patogénese quer da aterosclerose quer da psoríase. As partículas de HDL disfuncionais podem ser mediadoras de processos ateroscleróticos associados à psoríase mas também podem ser mediadoras na própria patogénese da psoríase, nomeadamente na perpetuação de processos inflamatórios, o que mereceria uma nova linha de investigação.

Será importante iniciar um estudo prospectivo, incluindo todas as formas clínicas de psoríase, que permita avaliar a evolução destas e de outras variáveis no tempo, antes e depois da introdução de terapêuticas sistémicas, e tentar estabelecer a sua validade como biomarcadores de risco CV na psoríase, assim como tirar conclusões sobre relações causais e efeitos de intervenções terapêuticas.

Esta tese foi escrita de acordo com a antiga ortografia.

Referências

1. Borges-Costa J, Silva R, Gonçalves L, Filipe P, Soares de Almeida L, Marques Gomes M. Clinical and Laboratory Features in Acute Generalized Pustular Psoriasis. *Am J Clin Dermatol*. 2011;12(4):271-276. doi:10.2165/11586900-000000000-00000.
2. Parisi R, Symmons DPM, Griffiths CEM, Ashcroft DM. Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. *J Invest Dermatol*. 2012;133(2):377-385. doi:10.1038/jid.2012.339.
3. Gudjonsson JE, Elder JT. Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol*. 2007;25(6):535-546. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.08.007.
4. Christophers E. Psoriasis-epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol*. 2001;26(4):314-320.
5. McCall CO. Psoriasis. *Pathol Case Rev*. 2011;16(1):2-9. doi:10.1097/PCR.0b013e318202d167.
6. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. 1985;13(3):450-456.
7. Tsoi LC, Spain SL, Ellinghaus E, et al. Enhanced meta-analysis and replication studies identify five new psoriasis susceptibility loci. *Nat Commun*. 2015;6:7001. doi:10.1038/ncomms8001.
8. Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. Psoriasis. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:385-422. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132448.
9. Schön MP, Boehncke W-H. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2005;352(18):1899-1912. doi:10.1056/NEJMra041320.
10. Morris A, Rogers M, Fischer G, Williams K. Childhood psoriasis: a clinical review of 1262 cases. *Pediatr Dermatol*. 18(3):188-198.
11. Brandrup F, Hauge M, Henningsen K, Eriksen B. Psoriasis in an unselected series of twins. *Arch Dermatol*. 1978;114(6):874-878.
12. Mueller W, Herrmann B. Cyclosporin A for psoriasis. *N Engl J Med*. 1979;301(10):555. doi:10.1056/NEJM197909063011016.
13. Gottlieb SL, Gilleaudeau P, Johnson R, et al. Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med*. 1995;1(5):442-447.

14. Richardson SK, Gelfand JM. Update on the natural history and systemic treatment of psoriasis. *Adv Dermatol.* 2008;24:171-196.
15. Krueger JG, Bowcock a. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64 Suppl 2:ii30-6. doi:10.1136/ard.2004.031120.
16. Davidson A, Diamond B. Autoimmune Diseases. *New Engl J Hum Genet.* 2001;345(5):340-350. doi:10.1056/NEJM200108023450506.
17. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007;449(7162):564-569. doi:10.1038/nature06116.
18. Gudmundsdottir AS, Sigmundsdottir H, Sigurgeirsson B, Good MF, Valdimarsson H, Jonsdottir I. Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? *Clin Exp Immunol.* 1999;117(3):580-586.
19. Anand S, Gupta P, Bhardwaj R, et al. Is psoriasis an autoimmune disease? Interpretations from an immunofluorescence-based study. *J Cutan Pathol.* 2017;44(4):346-351. doi:10.1111/cup.12891.
20. Frank Nestle PO, Kaplan DH, Barker J. Mechanisms of Disease. *N Engl J Med.* 2009;361:496-509.
21. Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE, Dixit VM, Nickoloff BJ. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet.* 1991;337(8735):211-214.
22. Freedberg IM, Tomic-Canic M, Komine M, Blumenberg M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol.* 2001;116(5):633-640. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.doc.x.
23. Xia Y-P, Li B, Hylton D, Detmar M, Yancopoulos GD, Rudge JS. Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis. *Blood.* 2003;102(1):161-168. doi:10.1182/blood-2002-12-3793.
24. Dyring-Andersen B, Velte Honoré T, Madelung A, et al. IL-17A and IL-22 producing neutrophils in psoriatic skin. *Br J Dermatol.* 2017. doi:10.1111/bjd.15533.
25. Sweeney CM, Tobin AM, Kirby B. Innate immunity in the pathogenesis of psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2011;303(10):691-705. doi:10.1007/s00403-011-1169-1.
26. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med.* 2009;206(9):1983-1994. doi:10.1084/jem.20090480.
27. Schmid M, Wege AK, Ritter U. Characteristics of 'Tip-DCs and MDSCs'

- and their potential role in leishmaniasis. *Front Microbiol.* 2012;3(MAR):74. doi:10.3389/fmicb.2012.00074.
28. Kim T-G, Kim DS, Kim H-P, Lee M-G. The pathophysiological role of dendritic cell subsets in psoriasis. *BMB Rep.* 2014;47(2):60-68. doi:10.5483/bmbrep.2014.47.2.014.
 29. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 Axis in the Immunopathogenesis of Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2009;129(6):1339-1350. doi:10.1038/jid.2009.59.
 30. Diani M, Altomare G, Reali E. T Helper Cell Subsets in Clinical Manifestations of Psoriasis. *J Immunol Res.* 2016;2016:7692024. doi:10.1155/2016/7692024.
 31. Coimbra S, Figueiredo A, Castro E, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. *Int J Dermatol.* 2012;51(4):389-398. doi:10.1111/j.1365-4632.2011.05154.x.
 32. Terui T, Ozawa M, Tagami H. Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop. *Exp Dermatol.* 2000;9(1):1-10.
 33. Ferreira BIRC, Abreu JLPDC, Reis JPG Dos, Figueiredo AMDC. Psoriasis and Associated Psychiatric Disorders: A Systematic Review on Etiopathogenesis and Clinical Correlation. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2016;9(6):36-43.
 34. Coimbra S, Oliveira H, Rocha-Pereira P, Figueiredo A, Santos-Silva A. The cross-talk between renal function, inflammation and psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol.* 2017;176(3):829-831. doi:10.1111/bjd.14913.
 35. Takeshita J, Grewal S, Langan SM, et al. Psoriasis and comorbid diseases: Epidemiology. *J Am Acad Dermatol.* 2017;76(3):377-390. doi:10.1016/j.jaad.2016.07.064.
 36. Kimball A, Gieler U, Linder D, Sampogna F, Warren R, Augustin M. Psoriasis: is the impairment to a patient's life cumulative? *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2010;24(9):no-no. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03705.x.
 37. Hawro T, Zalewska A, Hawro M, Kaszuba A, Królikowska M, Maurer M. Impact of psoriasis severity on family income and quality of life. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2015;29(3):438-443. doi:10.1111/jdv.12572.
 38. Kimball AB, Guérin A, Tsaneva M, et al. Economic burden of comorbidities in patients with psoriasis is substantial. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2011;25(2):157-163. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03730.x.

39. Mustonen A, Mattila K, Leino M, Koulu L, Tuominen R. The costs of psoriasis medications. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2013;3(2):169-177. doi:10.1007/s13555-013-0040-z.
40. Sohn S, Schoeffski O, Prinz J, et al. Cost of moderate to severe plaque psoriasis in Germany: a multicenter cost-of-illness study. *Dermatology*. 2006;212(2):137-144. doi:10.1159/000090654.
41. Schmitt JM, Ford DE. Work Limitations and Productivity Loss Are Associated with Health-Related Quality of Life but Not with Clinical Severity in Patients with Psoriasis. *Dermatology*. 2006;213(2):102-110. doi:10.1159/000093848.
42. Reed WB, Becker SW, Rohde R, Heiskell CL. Psoriasis and arthritis. Clinicopathologic study. *Arch Dermatol*. 1961;83:541-548.
43. Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *JAMA*. 2006;296(14):1735-1741. doi:10.1001/jama.296.14.1735.
44. Parisi R, Rutter MK, Lunt M, et al. Psoriasis and the Risk of Major Cardiovascular Events: Cohort Study Using the Clinical Practice Research Datalink. *J Invest Dermatol*. 2015;135(9):2189-2197. doi:10.1038/jid.2015.87.
45. Reich K. The concept of psoriasis as a systemic inflammation: implications for disease management. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26 Suppl 2:3-11. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04410.x.
46. Ahlehoff O, Gislason GH, Jørgensen CH, et al. Psoriasis and risk of atrial fibrillation and ischaemic stroke: a Danish Nationwide Cohort Study. *Eur Heart J*. 2012;33(16):2054-2064. doi:10.1093/eurheartj/ehr285.
47. Mehta NN, Yu Y, Pinnelas R, et al. Attributable risk estimate of severe psoriasis on major cardiovascular events. *Am J Med*. 2011;124(8):775.e1-6. doi:10.1016/j.amjmed.2011.03.028.
48. Mehta NN, Krishnamoorthy P, Yu Y, et al. The impact of psoriasis on 10-year Framingham risk. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(4):796-798. doi:10.1016/j.jaad.2012.05.016.
49. Torres T, Sales R, Vasconcelos C, Martins da Silva B, Selores M. Framingham Risk Score underestimates cardiovascular disease risk in severe psoriatic patients: implications in cardiovascular risk factors management and primary prevention of cardiovascular disease. *J Dermatol*. 2013;40(11):923-926. doi:10.1111/1346-8138.12267.
50. Samarasekera EJ, Neilson JM, Warren RB, Parnham J, Smith CH. Incidence of cardiovascular disease in individuals with psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *J Invest Dermatol*. 2013;133(10):2340-2346. doi:10.1038/jid.2013.149.

51. Armstrong EJ, Harskamp CT, Armstrong AW. Psoriasis and major adverse cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(2):1-10. doi:10.1161/JAHA.113.000062.
52. Abuabara K, Azfar RS, Shin DB, Neimann AL, Troxel AB, Gelfand JM. Cause-specific mortality in patients with severe psoriasis: a population-based cohort study in the U.K. *Br J Dermatol.* 2010;163(3):586-592. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09941.x.
53. Armstrong AW, Harskamp CT, Armstrong EJ. The association between psoriasis and hypertension. *J Hypertens.* 2013;31(3):433-443. doi:10.1097/HJH.0b013e32835bcce1.
54. Takeshita J, Wang S, Shin DB, et al. Effect of psoriasis severity on hypertension control: a population-based study in the United Kingdom. *JAMA dermatology.* 2015;151(2):161-169. doi:10.1001/jamadermatol.2014.2094.
55. Suárez-Fariñ As M, Li K, Fuentes-Duculan J, Hayden K, Brodmerkel C, Krueger JG. Expanding the Psoriasis Disease Profile: Interrogation of the Skin and Serum of Patients with Moderate-to- Severe Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2012;132(10):2552-2564. doi:10.1038/jid.2012.184.
56. Bonifati C, Mussi A, Carducci M, et al. Endothelin-1 levels are increased in sera and lesional skin extracts of psoriatic patients and correlate with disease severity. *Acta Derm Venereol.* 1998;78(1):22-26.
57. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, et al. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2010;55(2):500-507. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.145094.
58. Sriramula S, Haque M, Majid DSA, Francis J. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in angiotensin II-mediated effects on salt appetite, hypertension, and cardiac hypertrophy. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2008;51(5):1345-1351. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.102152.
59. Boehncke S, Thaci D, Beschmann H, et al. Psoriasis patients show signs of insulin resistance. *Br J Dermatol.* 2007;157(6):1249-1251. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08190.x.
60. Karadag AS, Yavuz B, Ertugrul DT, et al. Is psoriasis a pre-atherosclerotic disease? Increased insulin resistance and impaired endothelial function in patients with psoriasis. *Int J Dermatol.* 2010;49(6):642-646. doi:10.1111/j.1365-4632.2009.04358.x.
61. Armstrong AW, Harskamp CT, Armstrong EJ. Psoriasis and the risk of diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*

- Dermatol.* 2013;149(1):84-91. doi:10.1001/2013.jamadermatol.406.
62. Armstrong AW, Guérin A, Sundaram M, et al. Psoriasis and risk of diabetes-associated microvascular and macrovascular complications. *J Am Acad Dermatol.* 2015;72(6):968-77.e2. doi:10.1016/j.jaad.2015.02.1095.
 63. Granata M, Skarmoutsou E, Trovato C, Rossi GA, Mazzarino MC, D'Amico F. Obesity, Type 1 Diabetes, and Psoriasis: An Autoimmune Triple Flip. *Pathobiology.* 2017;84(2):71-79. doi:10.1159/000447777.
 64. Cohen AD, Sherf M, Vidavsky L, Vardy DA, Shapiro J, Meyerovitch J. Association between psoriasis and the metabolic syndrome: A cross-sectional study. *Dermatology.* 2008;216(2):152-155. doi:10.1159/000111512.
 65. Naldi L, Chatenoud L, Linder D, et al. Cigarette Smoking, Body Mass Index, and Stressful Life Events as Risk Factors for Psoriasis: Results from an Italian Case-Control Study. *J Invest Dermatol.* 2005;125(1):61-67. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23681.x.
 66. Armstrong AW, Harskamp CT, Armstrong EJ. The association between psoriasis and obesity: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Nutr Diabetes.* 2012;2(12):e54. doi:10.1038/nutd.2012.26.
 67. Paller AS, Mercy K, Kwasny MJ, et al. Association of Pediatric Psoriasis Severity With Excess and Central Adiposity. *JAMA Dermatology.* 2013;149(2):166. doi:10.1001/jamadermatol.2013.1078.
 68. Coimbra S, Catarino C, Santos-Silva A. The triad psoriasis-obesity-adipokine profile. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2016;30(11):1876-1885. doi:10.1111/jdv.13701.
 69. Zhu K-J, Zhang C, Li M, Zhu C-Y, Shi G, Fan Y-M. Leptin levels in patients with psoriasis: a meta-analysis. *Clin Exp Dermatol.* 2013;38(5):478-483. doi:10.1111/ced.12171.
 70. Correia B, Torres T. Obesity: a key component of psoriasis. *Acta Bio Medica Atenei Parm.* 2015;86(2):121-129.
 71. Maza A, Montaudié H, Sbidian E, et al. Oral cyclosporin in psoriasis: a systematic review on treatment modalities, risk of kidney toxicity and evidence for use in non-plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2011;25(s2):19-27. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.03992.x.
 72. Montaudié H, Sbidian E, Paul C, et al. Methotrexate in psoriasis: a systematic review of treatment modalities, incidence, risk factors and monitoring of liver toxicity. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2011;25(s2):12-18. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.03991.x.
 73. Carrascosa JM, Rocamora V, Fernandez-Torres RM, et al. Obesity and Psoriasis: Inflammatory Nature of Obesity, Relationship Between

- Psoriasis and Obesity, and Therapeutic Implications. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Ed.* 2014;105(1):31-44. doi:10.1016/j.adengl.2012.08.024.
74. Akhyani M, Ehsani AH, Robati RM, Robati AM. The lipid profile in psoriasis: a controlled study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007;21(10):1330-1332. doi:10.1111/j.1468-3083.2007.02260.x.
 75. Dreiher J, Weitzman D, Davidovici B, Shapiro J, Cohen AD. Psoriasis and dyslipidaemia: a population-based study. *Acta Derm Venereol.* 2008;88(6):561-565. doi:10.2340/00015555-0510.
 76. Miller IM, Skaaby T, Ellervik C, Jemec GB. Quantifying Cardiovascular Disease Risk Factors in Psoriasis patients - a Meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2013;1180-1187. doi:10.1111/bjd.12490.
 77. Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB, Gelfand JM. Prevalence of cardiovascular risk factors in patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 2006;55(5):829-835. doi:10.1016/j.jaad.2006.08.040.
 78. Miller IM, Ellervik C, Yazdanyar S, Jemec GBE. Meta-analysis of psoriasis, cardiovascular disease, and associated risk factors. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(6):1014-1024. doi:10.1016/j.jaad.2013.06.053.
 79. Farshchian M, Zamanian A, Farshchian M, Monsef A-R, Mahjub H. Serum lipid level in Iranian patients with psoriasis. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2007;21(6):802-805. doi:10.1111/j.1468-3083.2006.02099.x.
 80. Toker A, Kadi M, Yildirim AK, Aksoy H, Akçay F. Serum lipid profile paraoxonase and arylesterase activities in psoriasis. *Cell Biochem Funct.* 2009;27(3):176-180. doi:10.1002/cbf.1553.
 81. Ma C, Schupp CW, Armstrong EJ, Armstrong AW. Psoriasis and dyslipidemia: a population-based study analyzing the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014;28(8):1109-1112. doi:10.1111/jdv.12232.
 82. Mallbris L, Granath F, Hamsten A, Ståhle M. Psoriasis is associated with lipid abnormalities at the onset of skin disease. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(4):614-621. doi:10.1016/j.jaad.2005.11.1079.
 83. Pietrzak A, Kadzielewski J, Janowski K, et al. Lipoprotein (a) in patients with psoriasis: associations with lipid profiles and disease severity. *Int J Dermatol.* 2009;48(4):379-387. doi:10.1111/j.1365-4632.2009.03994.x.
 84. Pietrzak A, Michalak-Stoma A, Chodorowska G, Szepietowski JC. Lipid disturbances in psoriasis: an update. *Mediators Inflamm.* 2010;2010(535612). doi:10.1155/2010/535612.

85. Steyers CM, Miller FJ. Endothelial Dysfunction in Chronic Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci Int J Mol Sci*. 2014;15:11324-11349. doi:10.3390/ijms150711324.
86. Ludwig RJ, Herzog C, Rostock A, et al. Psoriasis: a possible risk factor for development of coronary artery calcification. *Br J Dermatol*. 2007;156(2):271-276. doi:10.1111/j.1365-2133.2006.07562.x.
87. Eder L, Jayakar J, Shanmugarajah S, et al. The burden of carotid artery plaques is higher in patients with psoriatic arthritis compared with those with psoriasis alone. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(5):715-720. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201497.
88. Yiu K-H, Yeung C-K, Chan H-T, et al. Increased arterial stiffness in patients with psoriasis is associated with active systemic inflammation. *Br J Dermatol*. 2011;164(3):no-no. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.10107.x.
89. Balci DD, Balci A, Karazincir S, et al. Increased carotid artery intima-media thickness and impaired endothelial function in psoriasis. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2009;23(1):1-6. doi:10.1111/j.1468-3083.2008.02936.x.
90. Fang N, Jiang M, Fan Y. Association Between Psoriasis and Subclinical Atherosclerosis: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(20):e3576. doi:10.1097/MD.0000000000003576.
91. Armstrong AW, Voyles S V, Armstrong EJ, Fuller EN, Rutledge JC. A tale of two plaques: convergent mechanisms of T-cell-mediated inflammation in psoriasis and atherosclerosis. *Exp Dermatol*. 2011;20(7):544-549. doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01308.x.
92. Takeshita J, Mohler ER, Krishnamoorthy P, et al. Endothelial cell-, platelet-, and monocyte/macrophage-derived microparticles are elevated in psoriasis beyond cardiometabolic risk factors. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(1):e000507. doi:10.1161/JAHA.113.000507.
93. Armstrong AW, Voyles S V, Armstrong EJ, Fuller EN, Rutledge JC. Angiogenesis and oxidative stress: common mechanisms linking psoriasis with atherosclerosis. *J Dermatol Sci*. 2011;63(1):1-9. doi:10.1016/j.jdermsci.2011.04.007.
94. Harrington CL, Dey AK, Yunus R, Joshi AA, Mehta NN. Psoriasis as a Human Model of Disease to Study Inflammatory Atherogenesis. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2017;312(5):ajpheart.00774.2016. doi:10.1152/ajpheart.00774.2016.
95. Briganti S, Picardo M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2003;17(6):663-669.
96. Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Rebelo I, Figueiredo A, Quintanilha A,

- Teixeira F. Dislipidemia and oxidative stress in mild and in severe psoriasis as a risk for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2001;303(1-2):33-39.
97. Tekin NS, Tekin IO, Barut F, Sipahi EY. Accumulation of oxidized low-density lipoprotein in psoriatic skin and changes of plasma lipid levels in psoriatic patients. *Mediators Inflamm*. 2007;2007:78454. doi:10.1155/2007/78454.
 98. Vanizor Kural B, Orem A, Cimşit G, Yandi YE, Calapoglu M. Evaluation of the atherogenic tendency of lipids and lipoprotein content and their relationships with oxidant-antioxidant system in patients with psoriasis. *Clin Chim Acta*. 2003;328(1-2):71-82.
 99. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, et al. Circulating oxidized LDL forms complexes with beta2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. *J Lipid Res*. 2003;44(4):716-726. doi:10.1194/jlr.M200329-JLR200.
 100. Kasahara J, Kobayashi K, Maeshima Y, et al. Clinical significance of serum oxidized low-density lipoprotein/beta2-glycoprotein I complexes in patients with chronic renal diseases. *Nephron Clin Pract*. 2004;98(1):c15-24. doi:10.1159/000079923.
 101. Lopez D, Kobayashi K, Merrill JT, Matsuura E, Lopez LR. IgG autoantibodies against beta2-glycoprotein I complexed with a lipid ligand derived from oxidized low-density lipoprotein are associated with arterial thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Clin Dev Immunol*. 10(2-4):203-211.
 102. Ames PRJ, Delgado Alves J, Lopez LR, et al. Antibodies against beta2-glycoprotein I complexed with an oxidised lipoprotein relate to intima thickening of carotid arteries in primary antiphospholipid syndrome. *Clin Dev Immunol*. 2006;13(1):1-9. doi:10.1080/17402520600554930.
 103. Forti N, Diamant J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87(5):671-679. doi:10.1590/S0066-782X2006001800019.
 104. Asztalos BF, Tani M, Schaefer EJ. Metabolic and functional relevance of HDL subspecies. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22(3):176-185. doi:10.1097/MOL.0b013e3283468061.
 105. Hafiane A, Genest J. High density lipoproteins: Measurement techniques and potential biomarkers of cardiovascular risk. *BBA Clin*. 2015;3:175-188. doi:10.1016/j.bbacli.2015.01.005.
 106. Phillips MC. New insights into the determination of HDL structure by

- apolipoproteins: Thematic review series: high density lipoprotein structure, function, and metabolism. *J Lipid Res.* 2013;54(8):2034-2048. doi:10.1194/jlr.R034025.
107. Rosenson RS, Brewer HB, Ansell B, et al. Translation of high-density lipoprotein function into clinical practice: Current prospects and future challenges. *Circulation.* 2013;128(11):1256-1267. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.000962.
 108. Birner-Gruenberger R, Schittmayer M, Holzer M, Marsche G. Understanding high-density lipoprotein function in disease: Recent advances in proteomics unravel the complexity of its composition and biology. *Prog Lipid Res.* 2014;56C:36-46. doi:10.1016/j.plipres.2014.07.003.
 109. Duffy D, Rader DJ. Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6(7):455-463. doi:10.1038/nrcardio.2009.94.
 110. Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature.* 2008;451(7181):904-913. doi:10.1038/nature06796.
 111. Röhrl C, Pagler TA, Strobl W, et al. Characterization of endocytic compartments after holo-high density lipoprotein particle uptake in HepG2 cells. *Histochem Cell Biol.* 2010;133(3):261-272. doi:10.1007/s00418-009-0672-3.
 112. Catapano AL, Pirillo A, Bonacina F, et al. HDL in innate and adaptive immunity. *Cardiovasc Res.* 2014;103(3):372-383. doi:10.1093/cvr/cvu150.
 113. Kimura T, Tomura H, Mogi C, et al. Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2006;281(49):37457-37467. doi:10.1074/jbc.M605823200.
 114. Bursill CA, Castro ML, Beattie DT, et al. High-Density Lipoproteins Suppress Chemokines and Chemokine Receptors In Vitro and In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(9).
 115. van der Vorst EPC, Vanags LZ, Dunn LL, Prosser HC, Rye K-A, Bursill CA. High-density lipoproteins suppress chemokine expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* 2013;27(4):1413-1425. doi:10.1096/fj.12-212753.
 116. Barter PJ, Nicholls S, Rye K-A, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory Properties of HDL. *Circ Res.* 2004;95(8):764-772. doi:10.1161/01.RES.0000146094.59640.13.
 117. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of

- protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995;96(6):2758-2767. doi:10.1172/JCI118345.
118. Tso C, Martinic G, Fan W-H, Rogers C, Rye K-A, Barter PJ. High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(5):1144-1149. doi:10.1161/01.ATV.0000216600.37436.cf.
 119. Nofer J-R, Brodde MF, Kehrel BE. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010;37(7):726-735. doi:10.1111/j.1440-1681.2010.05377.x.
 120. Brodde MF, Korpelaar SJA, Herminghaus G, et al. Native high-density lipoproteins inhibit platelet activation via scavenger receptor BI: role of negatively charged phospholipids. *Atherosclerosis.* 2011;215(2):374-382. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.026.
 121. Negre-Salvayre A, Dousset N, Ferretti G, Bacchetti T, Curatola G, Salvayre R. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(7):1031-1040. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.07.006.
 122. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21(April 2017):312-318. doi:10.1097/MOL.0b013e32833bcdcl.
 123. Davignon J. Apolipoprotein E and atherosclerosis beyond lipid effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(2):267-269. doi:10.1161/01.ATV.0000154570.50696.2c.
 124. Gaudreault N, Kumar N, Posada JM, et al. ApoE suppresses atherosclerosis by reducing lipid accumulation in circulating monocytes and the expression of inflammatory molecules on monocytes and vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(2):264-272. doi:10.1161/ATVBAHA.111.238964.
 125. Li K, Ching D, Luk FS, Raffai RL. Apolipoprotein e Enhances MicroRNA-146a in Monocytes and Macrophages to Suppress Nuclear Factor-kB-Driven Inflammation and Atherosclerosis. *Circ Res.* 2015;117(1):e1-e11. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.305844.
 126. Filou S, Lhomme M, Karavia EA, et al. Distinct Roles of Apolipoproteins A1 and e in the Modulation of High-Density Lipoprotein Composition and Function. *Biochemistry.* 2016;55(27):3752-3762. doi:10.1021/acs.biochem.6b00389.
 127. Fenjves ES, Gordon DA, Pershing LK, Williams DL, Taichman LB. Systemic distribution of apolipoprotein E secreted by grafts of epidermal keratinocytes: implications for epidermal function and gene

- therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(22):8803-8807.
128. Kontush A. Identifying new Risk Markers and Potential Targets: The Value of the Proteome. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2016;30(1):13-18. doi:10.1007/s10557-016-6656-3.
 129. Mehta NN, Li R, Krishnamoorthy P, et al. Abnormal lipoprotein particles and cholesterol efflux capacity in patients with psoriasis. *Atherosclerosis*. 2012;224(1):218-221. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.06.068.
 130. Holzer M, Wolf P, Curcic S, et al. Psoriasis alters HDL composition and cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res*. 2012;53(8):1618-1624. doi:10.1194/jlr.M027367.
 131. Tom WL, Playford MP, Admani S, et al. Characterization of Lipoprotein Composition and Function in Pediatric Psoriasis Reveals a More Atherogenic Profile. *J Invest Dermatol*. 2016;136(1):67-73. doi:10.1038/JID.2015.385.
 132. He L, Qin S, Dang L, et al. Psoriasis decreases the anti-oxidation and anti-inflammation properties of high-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2014;1841(12):1709-1715. doi:10.1016/j.bbalip.2014.09.008.
 133. Usta M, Turan E, Aral H, Inal BB, Gurel MS, Guvenen G. Serum paraoxonase-1 activities and oxidative status in patients with plaque-type psoriasis with/without metabolic syndrome. *J Clin Lab Anal*. 2011;25(4):289-295. doi:10.1002/jcla.20471.
 134. Ferretti G, Bacchetti T, Campanati A, Simonetti O, Liberati G, Offidani A. Correlation between lipoprotein(a) and lipid peroxidation in psoriasis: role of the enzyme paraoxonase-1. *Br J Dermatol*. 2012;166(1):204-207. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10539.x.
 135. Asefi M, Vaisi-Raygani A, Bahrehmand F, et al. Paraoxonase 1 (PON1) 55 polymorphism, lipid profiles and psoriasis. *Br J Dermatol*. 2012;167(6):1279-1286. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.11170.x.
 136. Marsche G, Holzer M, Wolf P. Antipsoriatic treatment extends beyond the skin: Recovering of high-density lipoprotein function. *Exp Dermatol*. 2014;701-704. doi:10.1111/exd.12483.
 137. Holzer M, Wolf P, Inzinger M, et al. Anti-psoriatic therapy recovers high-density lipoprotein composition and function. *J Invest Dermatol*. 2014;134(3):635-642. doi:10.1038/jid.2013.359.
 138. Ahlehoff O, Hansen PR, Gislason GH, et al. Myocardial function and effects of biologic therapy in patients with severe psoriasis: a prospective echocardiographic study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30(5):819-823. doi:10.1111/jdv.13152.

139. Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2010;134(1):33-46. doi:10.1016/j.clim.2009.07.002.
140. Roux-Lombard P, Pagano S, Montecucco F, Satta N, Vuilleumier N. Auto-antibodies as Emergent Prognostic Markers and Possible Mediators of Ischemic Cardiovascular Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;44(1):84-97. doi:10.1007/s12016-010-8233-z.
141. Profumo E, Buttari B, Riganò R. Oxidative stress in cardiovascular inflammation: its involvement in autoimmune responses. *Int J Inflamm*. 2011;2011:295705. doi:10.4061/2011/295705.
142. Delgado Alves J, Ames PRJ, Donohue S, et al. Antibodies to high-density lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*. 2002;46(10):2686-2694. doi:10.1002/art.10542.
143. Batuca JR, Ames PRJ, Amaral M, Favas C, Isenberg DA, Delgado Alves J. Anti-atherogenic and anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein are affected by specific antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2009;48(1):26-31. doi:10.1093/rheumatology/ken397.
144. Batuca JR, Ames PRJ, Isenberg D a., Delgado Alves J. Antibodies toward high-density lipoprotein components inhibit paraoxonase activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1108:137-146. doi:10.1196/annals.1422.016.
145. Ferreira I, Favas C AM and AJ. Antibodies towards HDL components in type 2 diabetes patients are associated with modifications in the anti-atherogenic properties of HDL. In: *Diabetologia*. Vol 54:1.; 2011:S277-S278.
146. Pagano S, Satta N, Werling D, et al. Anti-apolipoprotein A-1 IgG in patients with myocardial infarction promotes inflammation through TLR2/CD14 complex. *J Intern Med*. 2012;272(4):344-357. doi:10.1111/j.1365-2796.2012.02530.x.
147. Montecucco F, Braunersreuther V, Burger F, et al. Anti-apoA-1 auto-antibodies increase mouse atherosclerotic plaque vulnerability, myocardial necrosis and mortality triggering TLR2 and TLR4. *Thromb Haemost*. 2015;114(2):410-422. doi:10.1160/TH14-12-1039.
148. Vuilleumier N, Montecucco F, Hartley O. Autoantibodies to apolipoprotein A-1 as a biomarker of cardiovascular autoimmunity. *World J Cardiol*. 2014;6(5):314-326. doi:10.4330/wjc.v6.i5.314.

149. Quercioli A, Montecucco F, Galan K, et al. Anti-apolipoprotein A-1 IgG levels predict coronary artery calcification in obese but otherwise healthy individuals. *Mediators Inflamm*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/243158.
150. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. ApoA1 and ApoA1-specific self-antibodies in cardiovascular disease. *Lab Invest*. 2016;96(7):708-718. doi:10.1038/labinvest.2016.56.
151. El-Lebedy D, Rasheed E, Kafoury M, Haleem DA El, Awadallah E, Ashmawy I. Anti-apolipoprotein A-1 autoantibodies as risk biomarker for cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2016;30(4):580-585. doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.02.014.
152. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*. 1983;35(6):1126-1138.
153. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. *Clin Chem*. 1995;41(6):892-896.
154. Dati F, Tate J. Reference materials for the standardization of the apolipoproteins AI and B, and lipoprotein (a). *EJIFCC*. 2002.
155. Batuca JR. Humoral response towards high density lipoprotein: a new mechanism for atherogenesis - Tese de doutoramento em Ciências da Vida, especialidade Farmacologia. FCM, UNL. 2013.
156. Marsche G, Saemann MD, Heinemann A, Holzer M. Inflammation alters HDL composition and function: Implications for HDL-raising therapies. *Pharmacol Ther*. 2013;137(3):341-351. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.12.001.
157. Berrougui H, Isabelle M, Cloutier M, Grenier G, Khalil A. Age-related impairment of HDL-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 2007;48(2):328-336. doi:10.1194/jlr.M600167-JLR200.
158. Rodríguez-Carrío J, Alperi-López M, López-Mejías R, et al. Antibodies to paraoxonase 1 are associated with oxidant status and endothelial activation in rheumatoid arthritis. *Clin Sci*. 2016;130(21).
159. Xiao T, Yang C, Xiao Y, Song F. Serum apolipoprotein levels of psoriatic patients with normal serum lipid levels. *Chinese Med Sci J = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih*. 1997;12(4):224-228.
160. Karpouzis A, Caridha R, Tripsianis G, Michailidis C, Martinis G, Veletza SV. Apolipoprotein e gene polymorphism in psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2009;301(6):405-410. doi:10.1007/s00403-009-0968-0.
161. Seishima M, Mori S, Noma A. Serum lipid and apolipoprotein levels in

- patients with psoriasis. *Br J Dermatol*. 1994;130(6):738-742. doi:10.1111/j.1365-2133.1994.tb03411.x.
162. Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): A prospective study. *Lancet*. 2001;358(9298):2026-2033. doi:10.1016/S0140-6736(01)07098-2.
 163. Amaya-Amaya J, Montoya-Sánchez L, Rojas-Villarraga A. Cardiovascular involvement in autoimmune diseases. *Biomed Res Int*. 2014;2014:367359. doi:10.1155/2014/367359.
 164. Ahearn J, Shields KJ, Liu C-C, Manzi S. Cardiovascular disease biomarkers across autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 2015;161(1):59-63. doi:10.1016/j.clim.2015.05.024.
 165. Teixeira PC, Cutler P, Vuilleumier N. Autoantibodies to apolipoprotein A-1 in cardiovascular diseases: Current perspectives. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/868251.
 166. Rodriguez-Carrio J, Alperi-Lopez M, Lopez-Mejias R, et al. Antibodies to paraoxonase 1 are associated with oxidant status and endothelial activation in rheumatoid arthritis. *Clin Sci*. 2016;130(21):1889-1899. doi:10.1042/CS20160374.
 167. Huang Y, Ye HD, Gao X, et al. Significant interaction of APOE rs4420638 polymorphism with HDL-C and APOA-I levels in coronary heart disease in Han Chinese men. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):13414-13424. doi:10.4238/2015.October.28.3.
 168. Camont L, Lhomme M, Rached F, et al. Small, Dense High-Density Lipoprotein-3 Particles Are Enriched in Negatively Charged Phospholipids: Relevance to Cellular Cholesterol Efflux, Antioxidative, Antithrombotic, Anti-Inflammatory, and Antiapoptotic Functionalities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(12):2715-2723. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301468.
 169. White R, Giordano S, Datta G. Role of HDL-Associated Proteins and Lipids in the Regulation of Inflammation. *Adv Lipoprotein Res*. 2017. doi:10.5772/67141.